

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 12 月 12 日 (12.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/099133 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68, C12N 15/31, G01N 33/569, 33/53, 33/566
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/05107
- (22) 国際出願日: 2002 年 5 月 27 日 (27.05.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-165929 2001 年 5 月 31 日 (31.05.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 10 号 Osaka (JP).
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 大野 典也 (OHNO, Tsuneya) [JP/JP]; 〒158-0081 東京都 世田谷区深沢 2 丁目 5-15 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松久 明生 (MAT-SUHISA, Akio) [JP/JP]; 〒536-0025 大阪府 大阪市城東区森之宮 2 丁目 7-506 Osaka (JP).
- (51) 代理人: 角田 嘉宏, 外 (SUMIDA, Yoshihiro et al.); 〒650-0031 兵庫県 神戸市中央区東町 123 番地の 1 貿易ビル 3 階 有古特許事務所 Hyogo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IMPROVED METHOD FOR DETECTING AND IDENTIFYING MICROORGANISM CAUSATIVE OF INFECTION

(54) 発明の名称: 感染症原因微生物の検出および同定のための改良された方法

(57) Abstract: A microorganism causative of an infection is quickly and highly sensitively detected and/or identified by obtaining phagocytes from a clinical specimen containing phagocytes originating in a living body, immobilizing the obtained phagocytes, treating the phagocytes so as to enhance the permeability of the phagocyte membrane and expose DNA of the microorganism causative of the infection which is anticipated as being contained in the phagocytes, and then using a detection DNA probe hybridizable with the DNA under stringent conditions.

(57) 要約:

生体由来の食細胞を含む臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定し、食細胞膜の透過性を亢進させる処理および該食細胞中に存在すると予想される感染症原因微生物の DNA を露出させる処理を施し、ストリンジェントな条件下で該 DNA にハイブリダイゼーションすることのできる検出用 DNA プローブを用いて、迅速且つ高感度に、感染症原因微生物を検出および／または同定する。

明 細 書

感染症原因微生物の検出および同定のための改良された方法

5 技術分野

本発明は、感染症原因微生物の検出および同定のための改良された方法に関する。 また、感染症原因微生物を検出および／または同定するためのキット、臨床検体中の外来微生物の遺伝子をモニターする方法および敗血症原因微生物または菌血症原因菌を特定する方法に関する。

10

背景技術

従来より、血液中に存在する菌の証明法として血液培養法が広く用いられているが、培養・分離同定の操作に3～14日程度の日数がかかる上、検出率が約10%と低く、敗血症のような緊急を要する診断法としては、十分治療に

15 寄与していないのが現状である。

そこで、本発明者らは上記問題を解決するために、貪食細胞によって貪食された外来微生物を検出または同定するための方法、すなわち、貪食細胞中に存在する外来微生物由来の遺伝子を、該遺伝子に特異的にハイブリダイゼーションすることのできるプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを施すことで、その検出を図る方法を発明した（特公平7-40号）。

20

特公平7-40号に記載された方法に従って、敗血症が疑われた患者血液を用いて検査したところ、血液培養法と比較して約4倍の感度で菌を検出し、さらに24時間以内に判定できたことなどから、感染症分野において脚光を浴びるに至っている。

25 本願発明は、特公平7-40号に記載された発明、すなわち、生体由来の食細胞を含む臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定し、該食細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在すると予想される感染症原因菌のDNAを露出させる処理を施し、この露出DNAにストリンジェ

ントな条件下でハイブリダイゼーションできる検出用DNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより感染症原因菌を検出および／または同定するための方法について、この方法による検出効率・検出感度をさらに高めることを目的とする。

5

発明の開示

本発明は、以上詳説した現状に鑑みて成し遂げられたものであり、その要旨とするところは、以下のとおりである。

生体由来の食細胞を含む臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定
10 し、該食細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在すると
予想される感染症原因微生物のDNAを露出させる処理を施し、該DNAに
ストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションできる検出用DNAプ
ローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナル
により感染症原因微生物を検出および／または同定するための方法であっ
15 て、下記(1)～(8)の特徴、すなわち、

(1) 固定化する食細胞の密度 (x 個/ml) が、約 5×10^6 個/ml $< x$ 個/ml
 $<$ 約 1×10^8 個/ml であること、

(2) DNA露出工程においてリゾスタフィンが使用され、その力価が、
約 1 単位/ml～約 1,000 単位/ml であること、

20 (3) DNA露出工程においてリゾチームが使用され、その力価が、約
1,000 単位/ml～約 1,000,000 単位/ml であること、

(4) DNA露出工程においてN-アセチルムラミダーゼが使用され、その
力価が、約 10 単位/ml～約 10,000 単位/ml であること、

(5) DNA露出工程においてザイモラーゼが使用され、その力価が、約
25 50 単位/ml～約 500 単位/ml であること、

(6) in situハイブリダイゼーションの工程において界面活性剤を使用
すること、

(7) 検出用DNAプローブが、約 350～約 600 塩基長の鎖長を有する 1 種

以上のDNAプローブであること、および

(8) 検出用DNAプローブの濃度が、約 $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ ～約 $2.2\text{ng}/\mu\text{l}$ の濃度であること、

- の少なくとも1つ以上の特徴を有する、感染症原因微生物を検出および／
5 または同定するための方法である。

DNA露出工程にあっては、好ましくは、リゾスタフィン、リゾチーム、
N-アセチルムラミダーゼおよびザイモラーゼより選択される1つ以上の酵素
が使用され、そして、リゾスタフィンの力価が、約10単位/ml～約100単位/
ml、リゾチームの力価が約10,000単位/ml～約100,000単位/ml、N-アセチル
10 ムラミダーゼの力価が約100単位/ml～約1,000単位/ml、ザイモラーゼの力価
が約100単位/ml～約500単位/mlであるものを使用する。

DNA露出工程にあっては、好ましくは、酵素を使用し、そして、この酵
素を反応させる温度を約 26°C ～約 59°C とし、また、この酵素を反応させる反
応時間を約15分～約120分とする。

- 15 DNA露出工程にあっては、好ましくは、さらに食細胞の形態を保持させ
る物質、特に、フェニルメチルスルフォニルフルオリドを、好ましくは、
約 $10\mu\text{mol/l}$ ～約 10mmol/l の濃度で使用する。食細胞の形態を保持させる
物質として、好ましくは、ジメチルスルフォキシドにて溶解された物質を使
用する。

- 20 食細胞の形態を保持させる物質を、好ましくは、ジメチルスルフォキシド
にて溶解された物質とし、そして、ジメチルスルフォキシドはDNA露出工
程で用いられる溶液において5%未満の濃度で調製する。

In situハイブリダイゼーションの工程にあっては、DNAとDNAプロ
ープとが、界面活性剤、特に、アニオン界面活性剤、好ましくは、ドデシル
25 硫酸ナトリウム(SDS)の存在下でハイブリダイズされる。

In situハイブリダイゼーションの工程にあっては、好ましくは、ハイブ
リダイズ反応させる温度を約 25°C ～約 50°C とし、そして、ハイブリダイズ反
応させる反応時間を約30分～約900分とする。

固定工程の前に、得られた食細胞を支持担体上に支持させる工程をさらに含み、なおかつ、その支持担体を、3-アミノプロピルトリエトキシシランをコートしたスライドグラスとする。

シグナルの検出の際に、シグナルと細胞のコントラストを明確にさせるための色素を使用する。 また、臨床検体を、好ましくは、血液とする。

さらに、本発明によれば、食細胞を含む生体由来の臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定し、その細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、その食細胞中に存在すると予想される感染症原因微生物のDNAを露出させる処理を施し、該DNAにストリンジェントな条件下ハイブリダイゼーション
10 ンで検出用DNAプローブを用いて界面活性剤の存在下でin situハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより感染症原因微生物を検出および／または同定するためのキットであって、

(1) DNA露出工程において使用される酵素が、少なくとも、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼ、ザイモラーゼからなる群より
15 リ選択される1種以上の酵素であり、および

(2) 少なくとも1種以上の検出用DNAプローブを含む、
感染症原因微生物を検出および／または同定するためのキットも提供される。

また、本発明によれば、生体由来の食細胞を含む臨床検体中に含まれる食
20 細胞によって食食された外来微生物の遺伝子をモニターする方法であって、前出の感染症原因微生物の検出および／または同定方法におけるin situハイブリダイゼーション法を用いて該遺伝子を検出する工程を含み、該臨床検体中の外来微生物の遺伝子をモニターする方法が提供される。

そして、敗血症または菌血症の診断方法であって、前出の感染症原因微生物
25 物の検出および／または同定方法におけるin situハイブリダイゼーション法を用いて原因微生物の候補となる微生物の遺伝子を同定する工程を含み、同定された結果に基づいて敗血症原因微生物または菌血症原因菌を特定する方法も、本願発明によって提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、in situハイブリダイゼーションを(a) 界面活性剤(SDS)不使用下および(b) 界面活性剤(SDS)使用下で実施した結果を示す図である。

第2図は、種々の白血球細胞密度で固定した際の様子を示す図である。

- 5 第3図は、(a) *Staphylococcus aureus*および*Staphylococcus epidermidis*、(b) *Pseudomonas aeruginosa*および*Escherichia coli*、ならびに(c) *Enterococcus faecalis*に対する 溶菌酵素の活性を経時的に示す図である。

- 第4図は、(a) N-アセチルムラミダーゼ 300単位/ml、(b) リゾチーム 10,000単位/ml、および(c) リゾスタフィン 50単位/mlの溶菌活性に対する
10 DMSOの添加による濃度依存的効果を示す図である。

第5図は、白血球に形態劣化をもたらすプロテアーゼの作用を抑制するために用いるPMSFの添加効果を、(a) プロテアーゼ 0.2単位/mlのみ、(b) PMSF 1 μ mol/ml添加、(c) PMSF 10 μ mol/ml添加、(d) PMSF 0.1mmol/ml添加、および(e)PMSF 1 mmol/ml添加について示す図である。

- 15 第6図は、本発明に従って調製した食食サンプルにおいて、食細胞が細菌を食食して形態変化を起こしていることを示す図である。

- 第7図は、食食サンプルに対する酵素処理の効果を示す図で、(a) 酵素処理前の*Staphylococcus aureus*の食食サンプル、(b) 酵素処理前の*Enterococcus faecalis*の食食サンプル、(c) サンプル(a)を酵素処理した後の様子、
20 および(d) サンプル(b)を酵素処理した後の様子を示す図である。

第8図は、in situハイブリダイゼーションでの至適プローブ濃度の検討のために用いた食食サンプル塗抹用のスライドグラスを示す概略図である。

第9図は、in situハイブリダイゼーションでの至適温度の検討のために用いた食食サンプル塗抹用のスライドグラスを示す概略図である。

- 25 第10図は、(a) SAプローブおよび(b) PAプローブのジゴキシゲニンラベル化で得られる検出用プローブの鎖長とラベルによるシグナル強度を示すサザンブロット（上段）および電気泳動（下段）の図である。

第11図は、*Escherichia coli*食食サンプルに関するin situハイブリダイ

ゼーションにおいて、検出用プローブとして、(a) EC-24、(b) EC-34、(c) EC-39、および(d) プローブ(a)～(c)の混合プローブ(MIX)を用いた場合に認められたシグナル検出の結果を示す図である。

5 発明を実施するための最良の形態

本実施態様において使用することができる臨床検体としては、生体由来の食細胞が含まれる臨床検体であればいずれでも良く、例えば、血液、組織液、リンパ液、脳脊髄液、膿、粘液、鼻水、痰などの体液が挙げられる。また、糖尿病、腎障害、肝障害などの病態によっては、尿、腹水、透析排液など、
10 その他、鼻腔、気管支、皮膚、各種臓器、骨などを洗浄した後の洗浄液にも生体由来の食細胞が含有されるため、これらも本発明の臨床検体とすることができる。

加えて、皮膚、肺、腎、粘膜などの組織も本発明の臨床検体として用いることができる。これは、食細胞の一つであるマクロファージには、単球、
15 肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ、固定マクロファージ、遊離マクロファージ、ハンゼマンマクロファージ、炎症性マクロファージ、肝クッパー細胞、脳ミクログリア細胞などの様々な形態に変化するため、血液のみならず、これらを含む組織も本発明の臨床検体として用いることができる。
例えば、腎炎が疑われる患者より腎生検により腎組織を採取し、トリプシン
20 等の酵素を用いることにより細胞を剥離して該組織中に存在する食細胞を得、得られた食細胞を用いることによって、腎炎の原因微生物を検出および同定することができる。

本明細書で使用する「食細胞」の語は、外来微生物をはじめとする異物を自身の細胞内に取り込むことのできる細胞であれば特に限定されるものではなく、例えば、マクロファージ、単球、好中球、好酸球などが挙げられる。
25 また、U937細胞、HL60細胞などの食細胞系も使用できる。感染症の原因ともなる外来微生物としては、食細胞によって貪食される微生物であれば特に制限はなく、細菌、真菌、ウィルス、原虫、寄生虫等が含まれる。細菌

としては、例えば、ブドウ球菌、緑膿菌、腸球菌、大腸菌、連鎖球菌、肺炎球菌、結核菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、リステリア、エルシニア、ブルセラ等が挙げられる。真菌としては、例えば、カンジダ、アスペルギルス、アクチノミセス、コクシジオイデス、プラスミセス等が挙げられる。ウイルスとしては、例えば、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、エイズウイルス等が挙げられる。原虫としては、例えば、アメーバ赤痢、臍トリコモナス、マラリア、トキソプラズマ等が挙げられる。寄生虫としては、トリパノゾーマ等が挙げられる。特に、敗血症または菌血症の原因菌としては、例えば、グラム陽性菌であるスタフィロコッカス属 (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*)、グラム陰性菌である大腸菌 (*Escherichia coli*)、エンテロバクター (*Enterobacter cloacae*)、クレブシエラ (*Klebsiella pneumoniae*) 等の大腸菌類縁腸内細菌群 (*Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*)、好気性桿菌であるシュードモナス属 (*Pseudomonas aeruginosa*)、嫌気性菌であるクロストリジウム菌 (*Clostridium perfringens*)、バクテロイデス菌 (*Bacteroides fragilis*) 等が挙げられる。まれに、*Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Bacillus cereus*等が、原因菌となることもある。

臨床検体からの食細胞（白血球）画分の取得には、公知の方法を使用することができる。例えば、ヘパリン加静脈血約 5 ml（白血球数の少ない場合には 10 ml）を採取し、この血液と血液分離試薬（塩化ナトリウム 225 mg、デキストラン（分子量 200,000～300,000）1.5 g、滅菌精製水にて全量 25 ml に調製したもの）とを 4 : 1 程度の割合で混和した後、約 10℃～約 40℃で、約 15 分～約 120 分間、好ましくは、約 37℃で、約 30 分間静置することにより、白血球画分（上層）を取得することができる。

このようにして得た白血球画分を、0℃～約20℃にて、約100×g～約500×gで、約3分～約60分間、好ましくは、約4℃にて、約140×g～約180×gで、約10分間遠心分離することによって、白血球を得ることができる。

この際に赤血球が混入した場合、溶血操作を行うのが好ましい。例えば、

- 5 白血球のペレットに滅菌精製水1mlを加えて懸濁し、直ちに過剰量のPBS（塩化ナトリウム18.24g、リン酸一水素ナトリウム12水和物6.012g、リン酸二水素ナトリウム2水和物1.123g、滅菌精製水にて全量120mlにしたもの

（PBS原液；以下、単に「PBS原液」と称する）を滅菌精製水にて20倍に希釈したもの；以下、単に「PBS」と称する）を加えて等張化した後、再度4℃

- 10 下、約140×g～約180×gで、約10分間遠心分離すれば良い。また、上記遠心分離を行わなくとも、貪食細胞が本来保有する接着能力を利用して、後述するスライドグラスに接着させることもできる。

白血球を固定する方法として、例えば、カルノア固定を行うことができる。

具体的には、白血球を支持できる担体（支持担体）に白血球を支持せしめ、

- 15 カルノア固定液（エタノール：クロロホルム：酢酸＝6：3：1の容量比で混合した液）に約20分間程度浸した後、約50%～約90%、好ましくは、約75%エタノール液に約5分間浸し、完全に風乾する。

前記支持担体は、不溶性素材のものが好ましく、例えば、ガラス、金属、合成樹脂（ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、

- 20 ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂など）、多糖類（セルロース、アガロースなど）が好ましい。

不溶性支持担体の形状としては、例えば、板状、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。

特に、本発明の実施態様として好ましい支持担体は、スライドグラスを使用するのが好ましい。このようなスライドグラスとして、例えば、日本エ

- 25 アーブラウン社製のスライドグラス（商品番号MS311BL）が挙げられる。このスライドグラス（商品番号MS311BL）には、直径5mmの円形ウェルが14個設けられている。また、実際に使用する際には、細胞の接着性を上げる

ため、3-アミノプロピルトリエトキシシラン（APS、SIGMA社）をスライドグラスにコートしたAPSコートスライドグラスを使用するのが好ましい。その他、ポリ-L-リジンやゼラチンをコートしたスライドグラスも使用することができる。

- 5 APSコートスライドグラスを作製するには、まず、スライドホルダーにスライドグラス（商品番号MS311BL）を固定した後、希釈した中性洗剤で30分以上浸して洗浄し、水道水で洗剤を十分に取り除き、次に、スライドグラスを精製水にて洗浄し、高温（100℃以上）で十分に乾燥させた後、室温で放置冷却する。その後、スライドグラスを2%APS含有アセトンに1分間浸し、直ちにアセトン及び滅菌精製水で順次軽く洗浄した後に、風乾する。
- 10 さらに再度、スライドグラスを約1～約10%APS含有アセトンに1分間浸し、直ちにアセトンおよび滅菌精製水で順次軽く洗浄した後に、風乾する操作を行った後、約20℃～約60℃、好ましくは約42℃で乾燥させることにより作製することができる。
- 15 白血球をAPSコートスライドグラスに支持させる際には、各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し風乾するのが好ましい。固定化する食細胞の密度（ x 個/ml）が、 $約5 \times 10^6 \text{ 個/ml} < x \text{ 個/ml} < 約1 \times 10^8 \text{ 個/ml}$ 、好ましくは、 $約1 \times 10^7 \text{ 個/ml} \leq x \text{ 個/ml} \leq 約5 \times 10^7 \text{ 個/ml}$ に調製されたものを使用することが好ましい。
- 20 また、このような1ml当たりの食細胞の密度の変化に対応して、APSコートスライドグラスに固定される1ウェル当たりの白血球の細胞数（ y 個/ウェル（直径5mm））は、 $約2.5 \times 10^4 \text{ 個/ウェル} < y \text{ 個/ウェル} < 約5 \times 10^5 \text{ 個/ウェル}$ 、好ましくは、 $約5 \times 10^4 \text{ 個/ウェル} \leq y \text{ 個/ウェル} \leq 約2.5 \times 10^5 \text{ 個/ウェル}$ となるように調製するのが好ましい。具体的には、白血球画分を、4℃
- 25 にて、 $約140 \times g \sim 約180 \times g$ で、約10分間遠心分離することによって得た白血球ペレットに、少量のPBSを加えて懸濁し、血球計算盤を用いて白血球数を計測する。細胞数が、 $約5 \times 10^4 \text{ 個/ウェル} \sim 約2.5 \times 10^5 \text{ 個/ウェル}$ となるようにPBSで調製した白血球懸濁液5 μ lを、APSコートスライドグラスの

各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し、完全に風乾することにより調製することができる。

食細胞膜の透過性を亢進させる処理として、約3～約30分間PBSに浸し、その後、酵素前処理試薬（サポニン1.25g、*t*-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（比重1.068～1.075（20/4℃）, pH（5 w/v%）5.5～7.5）1.25ml、PBS原液25mlを混合し、滅菌精製水にて全量50mlに調製したもの）を、滅菌精製水で約2～約50倍に希釈した溶液に浸し、振とう機で約3～約30分間浸透する方法を用いることができる。

食細胞中に存在する感染症原因菌のDNAを露出させる処理として、スライドグラス1枚につき酵素試薬（N-アセチルムラミダーゼ、リゾチームおよび/またはリゾスタフィン）に酵素試薬溶解液（フェニルメチルスルフォニルフルオリド（PMSF）含有ジメチルスルフォキシド（DMSO）をPBSで約100倍希釈して調製したもの）を1ml加えて酵素試液を調製した後、約20℃～約60℃、好ましくは、約37℃～約42℃の湿潤箱内で、この酵素試液1mlを白血球塗抹部位に滴下し、約10～約60分間静置する。その後、0.2mol/l塩酸含有PBS（PBS原液に塩酸を加え、滅菌精製水にて20倍希釈し、塩酸の終濃度を0.2mol/lに調製したもの）に浸し、そのまま振とう機上で3～30分間浸透することによって目的を達成できる。DMSOは5%以上の濃度でリゾチームおよびリゾスタフィンの活性を低下させる可能性があるため、5%未満の濃度で使用するのが好ましい。食細胞の形態を保持させる物質としてのPMSF以外に他の公知のプロテアーゼ阻害剤、例えば、トシルリジンクロロメチルケトン（TLCK）およびそれらの混合物などを用いることもできる。その際には、適宜DMSOなどの溶解剤を変更すれば良い。

酵素試薬として用いる各酵素の好ましい力価範囲は、*Staphylococcus aureus*の溶菌においては、リゾスタフィンの力価は1単位/mlで十分効果を示すが、*Staphylococcus epidermidis*の溶菌においては、10単位/ml以上のリゾスタフィン力価が必要であった。ゆえに、リゾスタフィンの至適力価は、約1単位/ml～約1,000単位/ml、好ましくは、約10単位/ml～約100単位/mlに

設定するのが良い。また、*Enterococcus faecalis*の溶菌においては、リゾチームの力価を約10,000単位/mlで固定したとき、N-アセチルムラミダーゼ力価が約10単位/ml以下では溶菌されなかった。リゾチームについては、N-アセチルムラミダーゼ力価を100単位/mlに固定したとき、リゾチーム力価
5 が1,000単位/ml以下では溶菌されなかった。ゆえに、N-アセチルムラミダーゼの至適力価は、約10単位/ml～約10,000単位/ml、好ましくは、約100単位/ml～約1,000単位/ml、リゾチームの至適力価は、約1,000単位/ml～約1,000,000単位/ml、好ましくは、約10,000単位/ml～約100,000単位/mlに設定すると良い。また、原因菌が*Candida albicans*等の真菌である場合には、
10 ザイモラーゼ約50単位/ml～約500単位/ml、好ましくは、約100単位/ml～約500単位/mlの力価範囲にすると良い。また、ザイモラーゼを使用する際には、特に、PMSFまたは公知のプロテアーゼ阻害剤を使用するのが好ましい。

また、グラム陽性菌とグラム陰性菌の成分の違い、すなわち、ペプチドグリカンまたはリポポリサッカライドの違いにより、適宜使用酵素を選択する
15 ことができる。特に、グラム陽性菌、グラム陰性菌にかかわらず、より効果的に溶菌させるには、2種類以上の酵素を併用すればよい。本発明においては、リゾチーム、リゾスタフィンおよびN-アセチルムラミダーゼの3種を混合したものを使用することにより、単独の酵素によった場合と比較して溶菌活性が高まることが明らかとなった。

20 酵素処理温度は、*Staphylococcus aureus*は、好ましくは約4℃～約60℃、*Staphylococcus epidermidis*は、約25℃より高く、好ましくは約37℃以上、また、*Enterococcus faecalis*では、約25℃より高く約60℃未満、好ましくは約37℃～約42℃とすれば良い。ゆえに、至適酵素処理温度を、約37℃～約42℃に設定するのが最も好ましい。また、3種類の菌に対する共通の範
25 囲の内、限界とされる温度は約26℃～約59℃と予想できる。

また、酵素処理時間は、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Enterococcus faecalis*のいずれの食食サンプルでも酵素処理時間20分以上（0分および10分においては不適であった）であり、また、白血球中

に菌体は確認されなかったことから、少なくとも約15分以上、好ましくは約20分以上、さらに至適酵素処理時間を約30分～約60分とするのが好ましい。また、酵素処理時間を約15分～約120分としてもよい。

- また、N-アセチルムラミダーゼとは、*Enterococcus faecalis*の熱処理乾燥粉末とN-アセチルムラミダーゼを、2 mmol/l 塩化マグネシウムを含む5 mmol/l トリス塩酸緩衝液 (pH 6.0) 中で、37℃で、5 分間反応させた場合、600nmの吸光度を下げる酵素である。また、*Streptococcus salivarius* (IFO 3350)の熱処理細胞を、37℃、pH 7.0で1 分間に1 ug溶菌する酵素活性を1 単位とした場合、2,000単位/mg以上のものを使用するのが好ましい。
- 10 リゾチームは、*Micrococcus luteus*とリゾチームをPBS内で、37℃で、5 分間反応させた場合、600nmの吸光度を下げる酵素である。また、*Micrococcus luteus*を、35℃、pH 6.2で1 分間に540nmの吸収を0.001下げるときの酵素活性を1 単位とした場合、50,000単位/mg以上のものを使用するのが好ましい。
- 15 リゾスタフィンとは、*Staphylococcus epidermidis*とリゾスタフィンをPBS内にて37℃で5 分間反応させた場合、600nmの吸光度を下げる酵素である。また、*Staphylococcus aureus*を、37℃、pH 7.5で、10分間に620nmの吸収を0.240から0.125に下げるときの酵素活性を1 単位とした場合、500単位/mg以上のものを使用するのが好ましい。
- 20 ザイモラーゼ（商品名：ザイモリエイス、生化学工業）とは、*Arthrobacter lutesus*の培養液から調製された酵素であり、酵母生細胞の細胞壁に対して強い溶解活性を有している。ザイモラーゼに含まれる細胞壁溶解に関わる必須酵素は β -1,3-グルカン・ラミナリペンタオヒドロラーゼ (lanimari-pentaohydrolase) であり、 β -1,3-結合のグルコースポリマーに作用して、
- 25 主生産物としてラミナリペンタオースを生成する。ザイモリエイス-100Tは硫安分画により精製され、さらにアフィニティークロマトグラフィーにより精製され (Kitamura, K. et al. ; J. Ferment. Technol., 60, 257, 1982)、100,000単位/gの活性を有している。しかしながら、この酵素の

- 活性は、基質となる酵母の種類、培養条件および生育時期により変化することが知られている (Kitamura, K. et al. ; J. Gen. Appl. Microbiol., 20, 323, 1974, Kitamura, K. et al. ; Agric. Biol. Chem., 45, 1761, 1981, Kitamura, K. et al. ; Agric. Biol. Chem., 46, 553, 1982)。 ザイモリ
- 5 エイス-100Tには、 β -1,3-グルカナーゼを約 1.0×10^7 単位/g、プロテアーゼを約 1.7×10^4 単位/g、マンナーゼを約 6.0×10^4 単位/g 含み、DNaseおよびRNaseは認められない (Kitamura, K. et al. ; J. Gen. Appl. Microbiol., 18, 57, 1972)。 また、ザイモリエイスの至適pHは、約5.5~約8.5、好ましくは、約6.5~約7.5であり、至適温度は、約25℃~約55℃、好ましくは約35℃~約45℃である。 さらに、酵母（対数増殖期細胞）に対する溶菌
- 10 スペクトラム（属名）は、Ashbya、Candida、Debaryomyces、Eremothecium、Endomyces、Hansenula、Hanseniaspora、Kloeckera、Kluyveromyces、Lipomyces、Helschkowia、Pichia、Pullularia、Torulopsis、Saccharomyces、Saccharomycopsis、Saccharomycodes、Schwanniomycesなどが挙げられる。
- 15 特に、カンジダ属として、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)、カンジダ・トロピカリス (Candida tropicalis)、カンジダ・パラシロシス (Candida parasilosis)、カンジダ・ガラクタ (Candida galacta)、カンジダ・ギリエルモンジ (Candida guilliermondii)、カンジダ・クルセイ (Candida krusei)、クリプトコッカス・ネオフォーマンス (Cryptococcus neoformans)
- 20 等が挙げられる。 本酵素の賦活剤として、SH化合物、例えば、システイン、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどを用いることができる。

これらの属に属する菌も、本発明に使用できる。 この酵素は、ビール酵母懸濁液を基質として、約25℃で、2時間の内に、反応液（酵素：0.05~0.1mg/ml溶液 1ml、基質：ビール酵母懸濁液（2mg乾燥重量/ml） 3ml、

25 緩衝液：M/15リン酸緩衝液（pH 7.5） 5ml、滅菌精製水 1mlで全量10mlに調製したもの）の A_{800} が約30%減少するために必要な酵素活性を1単位とする。 ザイモリエイス-100Tは、100,000単位/gの活性を有している。

酵素試薬溶解液として用いるPMSF（プロテアーゼから白血球を保護してそ

の形態を保持させるために添加) の濃度として、 $10\mu\text{mol/l}$ 以上の濃度で効果が認められ、 0.1mmol/l 以上のPMSF濃度では、白血球の形態の劣化が完全に抑制されていたことから、約 $10\mu\text{mol/l}$ ～約 10mmol/l 、好ましくは約 0.1mmol/l ～約 1mmol/l の範囲であることが好ましい。 また、DMSOの濃度として、5%未満、好ましくは2%以下、さらには1%程度の濃度であることが好ましい。 ゆえに、酵素試薬溶解液は、 0.1mol/l フェニルメチルスルフォニルフルオライド(PMSF)含有ジメチルスルフォキシド(DMSO)をPBSで100～1,000倍希釈して調製したものであることが好ましい。

感染症原因菌のDNAを露出させる工程の後に、細胞膜タンパク質のアセチル化の工程を挿入しても良い。 具体的には、アセチル化試薬(トリエタノールアミン7.46g、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量50mlとしたもの)に無水酢酸を加え、滅菌精製水で約2倍～約50倍希釈、好ましくは約10倍希釈し、無水酢酸の終濃度を0.1～3.0%、好ましくは0.8%に調製したアセチレーション試薬にスライドグラスを浸し、振とう機上で5～30分間振とうすることにより行うことができる。 その後、75%、85%、98%エタノールに、順次、2～5分間ずつ浸し、完全に風乾させる。

また、細胞膜タンパク質のアセチル化工程の後に、感染症原因菌のDNAをアルカリ処理することにより一本鎖DNAとする工程を挿入することもできる。 具体的には、スライドグラスを、約 10mmol/l ～約 300mmol/l 、好ましくは、約 70mmol/l 水酸化ナトリウム含有PBS(PBS原液に水酸化ナトリウムを加え、滅菌精製水で20倍希釈し、水酸化ナトリウムの終濃度を 70mmol/l に調製したもの)に約2～約5分間浸すことにより行うことができる。 その後、75%、85%、98%エタノールに、順次、2～5分間ずつ浸し、完全に風乾させる。

露出された感染症原因菌のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションできる検出用DNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行うには、例えば、プローブ希釈液にて調製した検出用DNAプローブを含有する液(プローブ液)を塗抹部位に塗布し、約 25°C ～約 50°C 、

好ましくは、約37℃～約42℃の湿潤箱内で約1～約3時間、好ましくは、約2時間静置させる。

その後、ハイブリダイゼーション洗浄液（ハイブリダイゼーション原液（塩化ナトリウム13.15g、クエン酸三ナトリウム2水和物6.615g、滅菌精製水
5 にて全量75mlに調製したもの：以下、単に「ハイブリダイゼーション原液」と称する）を、ハイブリダイゼーション原液：滅菌精製水：ホルムアミド＝5：45：50の割合で混合して調製したもの）を3つの染色ビンに用意し、順次、約35～約45℃、好ましくは、約42℃で10分間ずつ浸す。その後、PBSに浸し、そのまま振とう機上で約5～約30分間振とうさせる。詳細には、
10 プローブ希釈液には、サケ精子DNA 600 μ l、100×デンハート溶液50 μ l、ハイブリダイゼーション原液500 μ l、ホルムアミド2250 μ l、50%硫酸デキストラン1000 μ lが含まれる。プローブ液は各検出用DNAプローブ15ngを含むのが好ましく、プローブ希釈液にて全量50 μ lとするのが良い。

SA、SE、PA、EF、EKのプローブ濃度は、約0.6ng/ μ l～約1.8ng/ μ l、好ましくは約0.6ng/ μ l～約1.2ng/ μ lとするのが良い。また、0.06ng/ μ lにおいては不適であり、0.6ng/ μ lにおいては適であったことから、少なくとも0.1ng/ μ l以上とするのが好ましい。さらに、2.4ng/ μ lにおいては不適であり、1.8ng/ μ lにおいては適であったことから、2.2ng/ μ l以下とするのが好ましい。また、陽性コントロールおよび陰性コントロールの至適濃度を、
20 それぞれ0.4～2.0ng/ μ lおよび0.6～2.0ng/ μ l、好ましくは共通して0.6～1.0ng/ μ lとするのが良い。

また、ハイブリダイゼーションを行う時間は、少なくとも30分以上、好ましくは60分以上、より好ましくは90分以上とするのが好ましい。さらに好ましい至適ハイブリダイゼーション時間は、約120分～約900分に設定すると
25 良い。

また、in situハイブリダイゼーションの工程においてドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの界面活性剤を使用するのが、検出感度を高めることができる点から好ましい。SDSの濃度は、1%以下が好ましく、より好ましく

は約0.1%～約0.5%、さらに好ましくは約0.25%とする。 SDSは、ハイブリダイゼーションの際に用いる溶液に添加されていればよく、プローブ希釈液またはプローブ液に事前に混合したものを用いてもよい。

さらに、検出用DNAプローブを、約350～約600塩基長、好ましくは、約
5 350～約550塩基長の鎖長を有する1種以上のDNAプローブとすることで、
食細胞内にプローブを円滑に導入し、取り込まれている外来微生物の遺伝子
への確実な接触が許容されるので好ましい。 対象となるプローブの塩基長
(塩基対の数)が、必ず上記塩基長範囲に収まらなければならないことを意
味するものではなく、プローブの塩基長の分布に、上記範囲の塩基長が含ま
10 れていればよいこととする。 これらプローブは、1種で用いても数種(1
種以上)で用いても良い。 1種以上のプローブとは、一菌種に対しハイブリ
ダイズできる複数種のプローブであっても良く、また、一菌種に対してプ
ローブは1つであるが、菌種が複数種存在するためにプローブの種類が複数
種となっても良く、プローブの種類が1種以上であれば特に限定されな
15 い。

これらプローブは、食細胞自体といかようにもハイブリダイズしない配列
を有するDNA断片を含むものとするのが好ましく、また他の種の菌に由来
する遺伝子と交差ハイブリダイズするものであってはならない。 例えば、
サブトラクション法を用いれば、短時間で特異プローブを作成することがで
20 きる。 これらプローブは、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ビ
オチン、ジゴキシゲニン(ジゴキシゲニン(DIG)-11-dUTP)等の非放射性同位
体標識用物質を用い、定法のニックトランスレーションに従って、調製およ
びラベルするとよい。 プローブの鎖長は、ニックトランスレーション反応
において添加するDNase I とDNAポリメラーゼ I の量比を変化させること
25 により、最も効率よくラベルできるように制御することができる。 例えば、
DNAプローブ(SA-24) 2 μ gを効率よくラベル化し、また、外来微生物
DNAと効率よくin situハイブリダイゼーションできるプローブ鎖長(約
350～約600の塩基長)に調節するには、全量100 μ lの反応液中に、10U/ μ l

のDNAポリメラーゼ I の $2 \mu\text{l}$ に対し、全量 $100 \mu\text{l}$ 中に約 $10 \sim$ 約 350mU 、好ましくは、約 $25 \sim$ 約 200mU 、より好ましくは約 $50 \sim$ 約 150mU となるように調製された DNase I の $6 \mu\text{l}$ が存在するようにすればよい。このとき、各酵素の容量および反応液全量などは、上記必須至適反応条件の比率が一定である限り、適宜変更しても良い。また、換言すれば、全量 $100 \mu\text{l}$ 中に DNA ポリメラーゼ I を 20U に対し、DNase I を約 $10 \sim$ 約 350mU 、好ましくは、約 $25 \sim$ 約 200mU 、より好ましくは、約 $50 \sim$ 約 150mU に調製すればよい。さらに換言すれば、1 単位の DNA ポリメラーゼ I に対し、約 $0.5/1,000 \sim$ 約 $17.5/1,000$ 、好ましくは、約 $1.25/1,000 \sim$ 約 $10/1,000$ 、より好ましくは、約 $2.5/1,000 \sim$ 約 $7.5/1,000$ 単位の DNase I を用いてニックトランスレーション反応を行うと良い。また、DNA $1 \mu\text{g}$ に対してみれば、DNA ポリメラーゼ I を約 10U 、DNase I を約 $5 \sim$ 約 175mU 、好ましくは、約 $12.5 \sim$ 約 100mU 、より好ましくは、約 $25 \sim$ 約 75mU に調製すれば良い。他のプローブについては、上記至適反応条件を参考にして DNA 量、DNA ポリメラーゼ I および DNase I の至適反応条件を決定することができ、また、効率よくラベル化し、外来微生物 DNA と効率よく *in situ* ハイブリダイゼーションできるプローブ鎖長 (約 $350 \sim$ 約 600 の塩基長) に調節することができる。

In situ ハイブリダイゼーションを行う際のストリンジेंटな条件とは、例えば、ホルムアミドが約 $30\% \sim$ 約 60% 、好ましくは、約 50% の存在下、約 $30 \sim$ 約 50°C 、好ましくは、約 $38 \sim$ 約 42°C でインキュベートし、その後、洗浄する条件である。

In situ ハイブリダイゼーションを行った後、ブロッキングの操作を行っても良い。具体的には、湿潤箱内でスライドガラス 1 枚につきブロッキング試薬 (ウサギ正常血清 2ml 、PBS 原液 0.5ml 、滅菌精製水にて全量 10ml に調製したもの) 1ml を塗抹部位に滴下し、 $15 \sim 60$ 分間静置する。その後、ブロッキング試薬を除去する。

菌由来の遺伝子 (ゲノム DNA または RNA) とハイブリダイズした結果に生じるシグナルの検出のためには、定法の抗原-抗体反応等を利用した呈色反応を

行うとよい。すなわち、ハイブリダイゼーションを終えた試料を十分に洗
浄した後に、ブロッキング操作を行い、次いで、抗FITC抗体、抗ジゴキシゲ
ニン抗体などの接合物、例えば、アルカリホスファターゼ接合物を用いて処
理し、次いで、接合物の発色系にてシグナルを発色し、ハイブリダイゼーシ
5 ョンの状況を確認する。例えば、プローブとして前記のジゴキシゲニン-
11-dUTPでラベルしたものをを用いた場合、抗ジゴキシゲニン-アルカリホス
ファターゼ接合物を用い、一般に使用されるアルカリホスファターゼに対す
る基質（ニトロブルーテトラゾリウムおよび5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリ
ルホスフェート等）を利用して検出すればよい。次いで、呈色反応を行っ
10 た後に洗浄した塗沫標本は、ナフトールブラック、Fast Green (20mg/50ml、
Wako Chemicals社製) 等で対比染色を行い、光学顕微鏡によって細胞内シグ
ナルが観察される。

詳細には、ハイブリダイゼーションによるシグナルを得るには、例えば、
検出用DNAプローブとしてジゴキシゲニン標識DNAプローブを用いる場
15 合には、標識抗体（アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶
液1.05単位、バッファーA（トリエタノールアミン746mg、塩化ナトリウム
17.5mg、塩化マグネシウム6水和物20.3mg、塩化亜鉛1.36mg、ウシ血清アル
ブミン1000mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量100mlに調製したもの）
12.6 μ lにて全量を14 μ lに調製したもの）を標識抗体希釈液（トリス-（ヒド
20 ロキシメチル）-アミノメタン8.48mg、塩化ナトリウム6.14mg、塩酸適量、滅
菌精製水適量にて全量0.7mlに調製したもの）で10~200倍希釈、好ましくは
50倍希釈した標識抗体液を調製し、この標識抗体液を塗沫部位に10 μ lずつ
滴下し、15~60分間静置すると良い。その後、標識抗体洗浄液（ポリソル
ベート20 1ml、PBS原液50ml、滅菌精製水にて全量100mlに調製したもの）
25 を2~50倍、好ましくは、10倍に希釈した溶液に浸し、そのまま振とう機上
で5~30分間浸透する。この操作を2回繰り返した後、発色前処理液1（ト
リス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタン6.06g、塩化ナトリウム2.92g、塩
酸適量、滅菌精製水適量にて全量50mlに調製したもの）と発色前処理液2（塩

- 化マグネシウム 6 水和物 5.08 g、滅菌精製水にて全量 50ml に調製したもの) を等量混合し、滅菌精製水で 5 倍程度に希釈した発色前処理液に浸し、そのまま振とう機上で 5～30 分間振とうすれば良い。その後、スライドガラス 1 枚につき発色試薬 (ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)/5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト (BCIP)) 1 ml を 0.2 μ m シリンジトップフィルターを装着したディスプレイブルシリンジを用いてろ過しながら、スライドガラスの塗抹部位に滴下し、湿潤箱内で約 10℃～約 45℃、好ましくは、約 37℃ で、約 15～約 60 分間遮光静置する。その後、発色試薬洗浄液 (トリス-(ヒドロキシメチル)-アミノメタン 606mg、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 2 水和物 186mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量 50ml に調製したもの) を約 2～約 50 倍、好ましくは、約 10 倍に希釈した溶液に約 2～約 10 分間浸し、風乾した後、対比染色液 (ファストグリーン FCF (食用緑色 3 号) 50mg、滅菌精製水適量にて全量 50ml に調製したもの) を 2～50 倍、好ましくは 10 倍に希釈した溶液および、約 0.1～約 5 %、好ましくは約 1 % の酢酸溶液に浸す。
- その後、前記発色試薬洗浄液を約 2～約 50 倍、好ましくは約 10 倍に希釈した溶液に再度浸して余分の前記対比染色液を洗い流し、完全に風乾すると良い。また、上記発色試薬は、別々に調製したものであっても良い。

- アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液は、ブロッティング用メンブレンにジゴキシゲニンラベルした DNA の 1 ng をプロットし、ブロッキング後、10,000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液で処理し、発色基質 (NBT/BCIP) を反応させると DNA のブロッティング部位が発色し、ジゴキシゲニンラベルしていない DNA で同様の操作をしても発色は認められないものを使用するのが好ましい。また、抗ジゴキシゲニン抗体は、ヒツジ由来のものが好ましい。詳細には、免疫したヒツジ血清より、イオン交換クロマトグラフィーと抗体カラムクロマトグラフィーで精製すると良い。

発色試薬 (NBT/BCIP 溶液、pH 9.0～10.0) は、ニトロテトラゾリウムブルー (NBT) 3.3mg、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト (BCIP) 1.65

mg、N,N-ジメチルホルムアミド99 μ g、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン121mg、塩酸適量、塩化ナトリウム58.4mg、塩化マグネシウム6水和物101.6mg、滅菌精製水適量にて全量10mlに調製したものであるのが好ましい。

- この発色試薬としては、アルカリフォスファターゼをラベルしたタンパク
- 5 質をプロットイング用メンブレンにプロットし、当該発色試薬でメンブレンを遮光室温で処理すると、プロット部位に暗紫色のシグナルが現れるものを使用するのが好ましい。

- 上記した対比染色を行う場合に、シグナルと細胞のコントラストをさらに明確にさせるため、食用色素、例えば、黄色4号(タートラジン)を使用する
- 10 ことができる。その理由は、基質によって紫色が呈色し、ナフトールブラックによって青色に呈色することから、類似色のために対比染色しづらいことが挙げられる。この方法を本発明に応用したところ、対比染色を行う際に有用であることが判明した。食用色素を用いるという手法は、これまでに無かった方法である。

- 15 ジゴキシゲニンを標識化する方法として、ニックトランスレーション法を用いることができる。その他に、PCR法、ランダムプライマーラベリング法、in vitroトランスクリプションラベリング法、ターミナルトランスフェラーゼラベリング法などを使用することができる。

- 判定は、光学顕微鏡で鏡検($\times 1,000$)するときに、上述した対比染色液に
- 20 より染まった単一ウェル内の細胞に於いて、青紫色の発色が1つでも認められた場合に陽性と判定するのがよい。

また、検出用プローブの作成方法として、日本国特許第2558420号、特許第2798499号、特許第2965543号、特許第2965544号および特許第3026789号などを参照することができる。

- 25 例えば、ワーキングセルバンクから釣菌して培養するには、ワーキングセルバンク(SA-24)を滅菌シャーレに作製した50 μ g/mlアンピシリン含有のL-プロス固形培地に、白金耳または使い捨てプラスチックループ等で画線塗抹する(釣菌)。

一晚培養した後に、シングルコロニーを採取し、 $50\mu\text{g/ml}$ アンピシリン含有のL-ブロス培地 5ml に植菌して、 37°C で終夜振とう培養する（前培養）。

前記培地 400ml 入り培養用フラスコに、前培養液を 2.5ml ずつ植菌して、約 37°C で終夜振とう培養する（本培養）。

- 5 次に、SA-24プラスミドDNAを抽出するために、本培養した培養液を、 4°C 、 $4,000\times g$ で10分間遠心分離して集菌する。培養上清を取り除き、STE（ 10mmol/l トリス塩酸（ $\text{pH } 8.0$ ）、 1mmol/l エチレンジアミン-四酢酸 2 ナトリウム塩（EDTA）、 0.1mmol/l 塩化ナトリウム）を 20ml 加えて菌体を再懸濁し、 4°C 、 $4,000\times g$ で10分間遠心分離して集菌する。 10mg/ml リゾチームを含む溶液-1（ 50mmol/l グルコース、 25mmol/l トリス塩酸（ $\text{pH } 8.0$ ）、 10mmol/l EDTA） 5ml を加え、菌体を懸濁して室温で5分間放置する。 溶液-2（ 0.2mmol/l 水酸化ナトリウム、 1% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）） 10ml を加え、転倒混和して氷上で10分間放置する。 氷冷した溶液-3（ 3mol/l 酢酸カリウム（ $\text{pH } 4.8$ ）） 7.5ml を加え、転倒混和して氷上で10分間放置する。
- 15 高速冷却遠心機により、 4°C 、 $45,000\times g$ で30分間遠心分離した後、上清を回収し、室温になるまで放置する。 放置した後、 0.6 容量（約 24ml ）のイソプロパノールを加え、転倒混和して室温で15分以上放置する。 高速冷却遠心機により、 25°C 、 $28,000\times g$ で30分間遠心分離した後、上清を捨て、 70% エタノールでペレットを洗浄して風乾する。 風乾後、TE（ 10mmol/l トリス塩酸（ $\text{pH } 8.0$ ）、 1mmol/l EDTA）を 8ml 加えて溶解する（プラスミドDNAの抽出）。
- 20

- 次に、SA-24含有プラスミドDNAを精製するために、得られたプラスミドDNAに、 10mg/ml エチジウムブロマイド $800\mu\text{l}$ および塩化セシウム 8.6g を加え、転倒混和して溶解させる。 その溶解液を超遠心用チューブに入れ、
- 25 キャップまたはシールをする。 垂直型ローターにより、 20°C 、 $500,000\times g$ で5時間超遠心した後、紫外線ライト照射下で注射筒または注射針を使用してプラスミドDNAのバンドを分取する。 分取したプラスミドDNA溶液に、等量のTE飽和 1-ブタノールを加えて転倒混和し、微量高速遠心機に

より、 $15,000 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を取り除く。この操作を繰り返
し、プラスミドDNA溶液中のエチジウムブロマイドを取り除く。次に、
TEを加えて1.5mlとし、脱塩カラム(NAP-10)で脱塩する。脱塩したプラス
ミドDNA溶液に3 mol/l酢酸ナトリウム溶液を30 μ l加えて混和した後、3
5 倍量の99.5%エタノールを加えて転倒混和し、 -20°C で30分以上放置する。

放置後、微量冷却高速遠心機により、 4°C 、 $15,000 \times g$ で20分間遠心分離
して上清を除いた後、冷70%エタノールを加えて懸濁し、再度、微量冷却高
速遠心機により、 4°C 、 $15,000 \times g$ で20分間遠心分離して上清を除き、プラ
スミドDNAの沈渣を減圧下乾固させる。プラスミドDNAに100 μ lのTE
10 を加えて完全に溶解させ、260nmの吸光度で濃度を測定する(SA-24含有プラ
スミドDNAの精製)。その後、SA-24含有プラスミドDNAの制限酵素処
理およびアガロース電気泳動によるSA-24のサイズチェックを行う。

SA-24含有プラスミドDNAの制限酵素処理およびアガロース電気泳動による
SA-24の精製を行うには、分子量チェックの終了したSA-24含有プラスミド
15 DNA 1 mgを、制限酵素HindIII単独もしくは他の制限酵素と組み合わせて、
 37°C で1.5時間以上の反応により消化する。プラスミドDNAを消化した後、
反応液の一部を0.8%アガロースで電気泳動して、消化が完全に終了したこ
とを確認する。消化を確認した後、分取用の0.8%アガロースゲルで電気
泳動し、SA-24のバンドを採取する。採取したSA-24をアガロースゲルから
20 抽出、精製して、吸光度計にて濃度を測定する。精製したSA-24の一部を
0.8%アガロースゲルで電気泳動し、シングルバンドであることを確認する。

SA-24のラベル化を行うには、精製したSA-24の2 μ gを用い、以下の表1
に記載の組成を有する反応液において、ジゴキシゲニンラベルを施すとよい。

表 1 : 標識付用反応液の組成

	配合量 (μ L)
DNAプローブ	X
10 \times L.B. ^(a)	10
100mmol/L ジチオスレイトール	10
dNTPs ^(b) (A、G、C 0.5mmol/L)	4
ジゴキシゲニン-dUTP ^(c) (0.4mmol/L)	5
DNase I ^(d)	6
10U/ μ L DNAポリメラーゼ I	2
滅菌精製水	Y
合 計	100

[凡例]

- (a) 10 \times L.B. : 0.5mol/L トリス塩酸 (pH 7.5)、
50mmol/L 塩化マグネシウム、
0.5mg/mL ウシ血清アルブミン
- (b) dNTPs : 0.5mmol/L 2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸、
0.5mmol/L 2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸、
0.5mmol/L 2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸
- (c) ジゴキシゲニン-dUTP : 0.4mmol/L ジゴキシゲニン-11-2'-デオキシ-
ウリジン-5'-三リン酸
- (d) DNase I : デオキシリボヌクレアーゼ I を、全量100 μ Lあたり50~150mUの
使用量となるよう25mmol/L トリス塩酸 (pH 7.5)、50%グリセ
リン溶液で希釈して上記配合量とする。

表 1 において、Xは、プローブ原液の濃度に応じて上記好ましいプローブ濃度となるように添加することができる容量であり、この容量に伴い精製水量Yを決定して最終容量を調整する。

ラベル化後、反応液にTEを100 μ l加えて反応を停止させる。 反応停止液
5 をスピncラムに注入し、4℃、380 \times gで10分間遠心分離して、遊離のヌ
クレオチドを除く。 次に、溶出液の濃度を吸光度計により測定し、TEで10
ng/ μ lに調製する。

ラベル化を確認するために、ラベルしたSA-24の0.5 μ lをメンブレンに滴

- 下し、風乾する。ブロッキング試薬にメンブレンを浸し、室温で30分間ブロッキングする。0.1mol/l トリス塩酸(pH 7.5)、0.15mol/l塩化ナトリウムで5,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液に、メンブレンを室温で30分間浸す。0.1mol/lトリス塩酸(pH 7.5)、
- 5 0.15mol/l 塩化ナトリウムにメンブレンを浸し、室温で10分間振とうして2回洗浄する。0.5mol/lトリス塩酸 (pH 9.5)、0.15mol/l塩化ナトリウム、50mmol/l塩化マグネシウムに、メンブレンを室温で10分間浸す。発色試薬にメンブレンを室温で遮光下、10分間浸す。メンブレンをTEに浸し、発色を停止させる。スポット下部分の青紫色の発色で、ラベル化の確認を行う。
- 10 スピンカラムを作製するには、1 mlのディスポーザブルシリンジに、少量の滅菌済みグラスウールを充填する。1 mmol/l トリス塩酸 (pH 7.5)、1 mmol/lのEDTA、0.1%SDSで膨潤させたセファデックスG-50をシリンジにつめる。15mlのディスポーザブルコニカルチューブにシリンジを入れ、4℃、320×gで10分間遠心分離し、余分の緩衝液を落とす。ディスポーザブル
- 15 コニカルチューブからシリンジを抜き、排出された緩衝液を捨てた後、1.5 mlのエッペンドルフ型チューブをディスポーザブルコニカルチューブの底に入れ、その上にシリンジを入れて作製する。

プローブの特異性を確認するため、以下の手順に従って、ドットプロットハイブリダイゼーションを行うとよい。

- 20 まず、スポットした各ゲノムDNAを変性するために、定法に従い0.5mol/l水酸化ナトリウム、1.5mol/l 塩化ナトリウム溶液で飽和した濾紙（ワットマン社製 3 MM）上に、調製した各種細菌ゲノム100ngをナイロンメンブレン（ポールバイオダイナタイプB、日本ポール社製）にスポットし、風乾したメンブレンを10分間静置する。次に、0.5mol/l トリス塩酸 (pH 7.5)、
- 25 1.5mol/l 塩化ナトリウム溶液で飽和した前出の濾紙上に10分間静置して変性DNAを中和する。さらに、2×SSC (Standard Saline Citrate) 溶液で飽和した前記濾紙上に5分間静置し、リンスする。その後、メンブレンを風乾し、2×SSC溶液にメンブレンを浸し、5分間浸透する。定法に従

い、プラスチックバッグ内でプレハイブリタイゼーション溶液にメンブレンを浸し、42℃、60分間親和させる。プラスチックバッグ内で、プローブ 400ngを含むハイブリタイゼーション溶液15ml内にメンブレンを浸し、42℃で、一晚反応させる。次に、2×SSC、0.1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）溶液にメンブレンを浸し、5分間洗浄する（2回繰り返す）。その後、0.1×SSC、0.1% SDS溶液にメンブレンを浸し、60℃、10分間洗浄する（3回繰り返す）。2×SSC溶液にメンブレンを浸し、5分間洗浄する。メンブレンを3%ウシ血清アルブミン、1%ブロッキングバッファー（ベーリンガー社製）、0.1mol/l トリス塩酸（pH 7.5）、0.15mol/l 塩化ナトリウム溶液にメンブレンを浸し、30分間おだやかに振とうする。その後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（ベーリンガー社製）を、0.1mol/l トリス塩酸（pH 7.5）、0.15mol/l 塩化ナトリウム溶液で5,000倍希釈した溶液にメンブレンを浸し、30分間おだやかに振とうする。次に、0.1mol/l トリス塩酸（pH 7.5）、0.15mol/l 塩化ナトリウム溶液にメンブレンを浸し、15分間振とうする（2回）。0.1mol/l トリス塩酸（pH 9.5）、0.1mol/l 塩化ナトリウム、5mmol/l 塩化マグネシウム溶液にメンブレンを浸し、5分間振とうする。NBT-BCIP溶液（GIBCO BRL社製）にメンブレンを浸し、遮光下で発色反応させる。TE（10mmol/l トリス塩酸（pH 8.0）、1mmol/l EDTA）にメンブレンを浸し、発色反応を止め、風乾する。プレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液を、以下の表2に示す。

表 2

[単位：ml]

	プレハイブリダイゼーション溶液	ハイブリダイゼーション溶液
ホルムアミド	7.5	6.75
20×SSC溶液	3.75	3.75
100×デンハート溶液	0.75	0.15
0.5mol/Lリン酸緩衝液	0.75	0.6
滅菌蒸留水	1.5	1.95
10mg/mLサケ精子DNA	0.75	0.3
50%硫酸デキストラン	---	1.5
合計液量	15.0	15.0

In situハイブリダイゼーションの工程において使用される界面活性剤としては、公知の界面活性剤が使用できる。界面活性剤は、アニオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤、カチオン界面活性剤および両性界面活性剤に大別される。

- 5 アニオン界面活性剤は、陰イオン界面活性剤とも呼ばれ、水中で電離して有機陰イオンとなるものである。界面活性剤の分子中の親油基をRとして表現すると、RCOONa、RSO₃Na、RSO₄Naなどがある。RCOONaのように弱酸性基を含有する界面活性剤の水溶液は加水分解しやすく弱アルカリ性であるが、RSO₃Na、RSO₄Naなどの強酸性基を有する界面活性剤の水溶液は加水分解
- 10 を受けにくく、中性となる。陰イオン性であるから、多量の陽イオン性物質の存在で界面活性を失うことがあり、また強酸性にした時にも失活する。

非イオン性界面活性剤は、親水基が非イオン性のものをいう。親水基として酸化エチレン基(-CH₂CH₂O-)が多用され、この基の数が多くなる程親水性が増す。反対に、親油基の炭素数が増加すると、親油性が増加する。従

15 って、親水性・親油性を様々に変化させた界面活性剤が得られるのが特徴である。非イオン性界面活性剤は、水中で電離せず、無機塩の影響も受けにくいいため、生体に及ぼす作用も少ない。しかも、洗浄作用は、強力で、泡

立ちは比較的少ない為、洗剤のみならず、医薬品、化粧品、食品などに広く使用される。水溶性の非イオン性界面活性剤は温度が上昇すると、ある温度で水に溶解しにくくなり、水溶液が濁り出すが、これは親水基と水との水素結合が切断されるために生じる。

- 5 カチオン界面活性剤は、陽イオン界面活性剤ともいう。水中で、電離して有機陽イオンとなるものである。カチオン界面活性剤は、一般に洗浄作用は大きくはないが、細菌などのアニオン性のものと強く結合するため、殺菌作用が大きい。また、繊維やプラスチックの帯電防止能もある。カチオン界面活性剤の代表的なもので、ドデシルトリメチルクロリド
- 10 $[\text{C}_{12}\text{H}_{25}(\text{CH}_3)_3\text{N}]\text{Cl}$ は水溶性であるが、ジドデシルジメチルアンモニウムクロリド $[(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2(\text{CH}_3)_2\text{N}]\text{Cl}$ は水に溶解しにくく、水中では2分子膜状のベシクルを形成し、ベンゼンには溶解する。

両性界面活性剤は、分子内にアニオン基とカチオン基の両者を併せ持っている界面活性剤である。水溶液中での電離状態はアミノ酸に類似しており、

- 15 両性界面活性剤には、アミノ酸誘導体が多く存在する。従って、アミノ酸と同様に等電点を有し、等電点よりアルカリ性側ではアニオン界面活性剤として、酸性側ではカチオン界面活性剤として作用する。等電点で水溶性は最低となり、表面張力も最も低下する。両性界面活性剤は、殺菌剤、帯電防止剤などに用いられる。
- 20 また、アニオン界面活性剤は、カルボン酸型、スルホン酸型、硫酸エステル型およびリン酸エステル型に分けられ、非イオン性界面活性剤は、エステル型、エーテル型、エステルエーテル型およびアルカノールアミド型に分けられる。カチオン界面活性剤は、アルキルアミン塩型および第四級アンモニウム塩型に分けられ、両性界面活性剤は、カルボキシペタイン型、2-アルキルイミダゾリンの誘導型およびグリシン型に分けられる。
- 25

さらに、アニオン界面活性剤のカルボン酸型は、脂肪酸モノカルボン酸塩、N-アシルサルコシン塩およびN-アシルグルタミン酸塩に細分される。それぞれの代表例として、脂肪酸モノカルボン酸塩には、ラウリン酸ナトリウム

および薬用せっけんがあり、N-アシルサルコシン塩は、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、N-アシルグルタミン酸塩にN-ラウロイルグルタミン酸二ナトリウムがある。 また、スルホン酸型は、ジアルキルスルホコハク酸塩、アルカンスルホン酸塩、アルファオレフィンスルホン酸塩、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル(分岐鎖)ベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸塩、ナフタレンスルホン酸塩-ホルムアルデヒド縮合物およびN-メチル-N-アシルタウリン塩に細分される。 代表例として、ジアルキルスルホコハク酸塩は、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、アルカンスルホン酸塩は、ドデカンスルホン酸ナトリウム、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩には直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル(分岐鎖)ベンゼンスルホン酸塩はドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸塩はブチルナフタレンスルホン酸ナトリウム、N-メチル-N-アシルタウリン塩にはN-メチル-N-ステアロイルタウリンナトリウムがある。 また、硫酸エステル型は、アルキル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩および油脂硫酸エステル塩に細分される。 代表例として、アルキル硫酸塩は、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびセチル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩はポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミンがある。 また、リン酸エステル型は、アルキルリン酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸塩およびポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルリン酸塩に細分される。 代表例を挙げると、アルキルリン酸塩には、モノラウリルリン酸二ナトリウムがある。 ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸塩には、リン酸ナトリウムポリオキシエチレンラウリルエーテルおよびリン酸ポリオキシエチレンオレイルエーテル(8MOL)がある。

非イオン性界面活性剤のエステル型は、脂肪酸グリセリン、脂肪酸ソルビタンおよび脂肪酸ショ糖エステルに細分される。 それぞれの代表例として、脂肪酸グリセリンは、モノステアリン酸グリセリン、脂肪酸ソルビタンは、

モノステアリン酸ソルビタン、トリオレイン酸ソルビタン、セスキオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、ポリソルベート20（ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル）、ポリソルベート60およびポリソルベート80、脂肪酸ショ糖エステルはステアリン酸ショ糖エステルがある。また、エーテル型は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールに細分される。代表例を挙げると、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとして、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテルおよびポリオキシエチレンセチルエーテルがあり、また、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとして、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルがある。また、エステルエーテル型は、脂肪酸ポリエチレングリコールおよび脂肪酸ポリオキシエチレンソルビタンに細分される。それぞれの代表例は、脂肪酸ポリエチレングリコールは、オレイン酸ポリエチレングリコール、脂肪酸ポリオキシエチレンソルビタンには、パルミチン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートがある。また、アルカノールアミド型は、脂肪酸アルカノールアミドの1つのみである。代表例は、ラウリン酸ジエタノールアミドである。

カチオン界面活性剤のアルキルアミン塩型には、モノアルキルアミン塩、ジアルキルアミン塩およびトリアルキルアミン塩があり、代表例は、モノステアリルアミン塩酸塩である。また、第四級アンモニウム塩型は、塩化（または臭化、沃化）アルキルトリメチルアンモニウム、塩化（または臭化、沃化）ジアルキルジメチルアンモニウムおよび塩化アルキルベンザルコニウムに細分される。それぞれの代表例は、塩化（または臭化、沃化）アルキルトリメチルアンモニウムとして、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化（または臭化、沃化）ジアルキルジメチルアンモニウムとして、塩化ジステアリルジメチルアンモニウム、塩化アルキルベンザルコニウムは塩化ラウリルベンザルコニウムがある。

両性界面活性剤のカルボキシベタイン型は、アルキルベタインの1つのみである。 代表例は、ラウリルベタインである。 また、2-アルキルイミダゾリンの誘導型は、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインの1つのみである。 代表例として、2-ウンデシル

5 -N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインが挙げられる。 また、グリシン型は、アルキル(又はジアルキル)ジエチレントリアミノ酢酸があり、代表例として、ジオクチルジエチレントリアミノ酢酸が挙げられる。

さらに、上記代表例に加えて、Triton X-100、ラウリルサルコシン、サポ

10 ニン、BRIJ35、アルキルアリルポリエーテルアルコール、高級アルコール硫酸化物、N-ココイル-L-アルギニンエチルエステルDL-ピロリドンカルボン酸塩、N-ココイル-N-メチルアミノエチルスルホン酸ナトリウム、コレステロール、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン、スクワラン、ステアリルアルコール、ステアリン酸ポリオキシシル40、セタノール、セトマクロゴール

15 1000、セバシン酸ジエチル、ノニルフェノキシポリオキシエチレンエタン硫酸エステルアンモニウム、ポリオキシエチレンオレイルアミン、ポリオキシエチレンソルビットミツロウ、ポリオキシシル35ヒマシ油、マクロゴール400、N-ヤシ油脂肪酸アシルL-アルギニンエチル・DL-ピロリドンカルボン酸塩、ラウリルジメチルアミンオキシド液、ラウロマクロゴール、メチルセルロー

20 ス、CMC（カルボキシメチルセルロース）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油20およびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、CHAPS、デオキシコール酸、ジギトニン、n-ドデシルマルトシド、ノニデットP40、n-オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、ラウリル酸シュクロース、ドデシルポリ（エチレングリコールエーテル）n, n-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-

25 プロパンスルフォネート等も挙げることができる。

上掲の各種界面活性剤は、in situハイブリダイゼーションの工程で使用されることが重要であり、その使用法は特に限定されない。 例えば、プローブ液またはプローブ希釈液中に混合されていても良いし、プローブ液と

は別に調製した界面活性剤を含有する溶液を、プローブ液を塗抹部位に塗布する前、同時または後に添加しても良いし、当業者は適宜変更することができる。

- 5 なお、本発明において、陽性コントロールプローブが必要であれば、次のように作製することができる。例えば、まず、U937細胞（ATCC CRL-1593. 2）のゲノムDNAの抽出と精製を行うには、37℃、5 %炭酸ガスインキュベーター内で、細胞培養フラスコ（175cm²）内のRPMI1640培地（25ml）を用い、U937細胞を培養する。U937培養液を50mlの遠沈管に入れ、4℃、220×gで10分間遠心分離し、U937細胞を回収する。細胞を10mlのPBSで懸濁洗
10 淨し、再度4℃、180×gで10分間遠心分離し、細胞を回収する。その後、上清を捨て、細胞を1mlの200μg/mlプロテナーゼK含有1 %SDS含有TE溶液で懸濁し、37℃で30分間放置する。フェノール抽出を3～4回繰り返し、除蛋白を行う。エタノール沈殿により析出したゲノムを回収し、500μlの2.5μgリボヌクレアーゼ含有滅菌精製水に溶解し、42℃で30分間放置する。
15 フェノール抽出を2～3回繰り返し、除蛋白を行う。エタノール沈殿により析出したゲノムを回収し、500μlのTEに溶解する。その後、吸光度計により濃度を測定し、ジゴキシゲニンラベルに供することにより、陽性コントロールプローブを作製することができる。また、陽性コントロールプローブは、U937ゲノムを100ngスポットしたメンブレンに、陽性コントロールプ
20 ローブをドットハイブリダイゼーションするとき、ハイブリッド形成が確認できるものを用いるのがよい。陰性コントロールプローブが必要であれば、公知の方法で作製することができる。

- また、本発明には、食細胞を含む生体由来の臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定し、該食細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食
25 細胞中に存在すると予想される感染症原因菌のDNAを露出させる処理を施し、このDNAにストリンジェントな条件下ハイブリダイゼーションできる検出用DNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより感染症原因菌を検出および／または同定するためのキ

ットであって、DNA露出工程で使用される酵素が、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼ、ザイモラーゼからなる群より選択される少なくとも1種以上の酵素、界面活性剤が添加されたプローブ液、1種以上の検出用DNAプローブを有することを特徴とする、感染症原因菌を検出および／または同定するためのキットも含まれる。キットには、後出の実施例に示す、血液分離試薬、酵素前処理試薬、酵素試薬、アセチル化試薬、プローブ液、ブロッキング試薬、標識抗体、標識抗体希釈液、発色前処理液-1、発色前処理液-2、発色試薬、対比染色液、PBS原液、ハイブリダイゼーション原液、標識抗体洗浄液、発色試薬洗浄液、APSコートスライドガラス、プローブ希釈液、バッファーA等が含まれる。これらのうち、少なくとも酵素試薬とプローブ液を具備することが好ましい。また、本発明に使用する各種試薬、例えば、クロロホルム、エタノール、無水酢酸、DMSO、PM SF、ホルムアミド、酢酸、塩酸、水酸化ナトリウム等を含んでいても良い。

さらに、低速遠心機、恒温機、血球計算盤、振とう機、湿潤箱、恒温槽、光学顕微鏡、可変式ピペット、採血管、チップ、ピペット、染色ビン、メスシリンダー、注射筒、 $0.2\mu\text{m}$ シリンジトップフィルターの機械や器具を含んでいても良い。

また、本発明は、生体由来の食細胞を含む臨床検体中に含まれる食細胞によって貪食された外来微生物の遺伝子をモニターする方法を提供する。さらに、本発明は、原因菌の候補となる微生物の遺伝子を同定する工程を含み、同定された結果に基づいて敗血症原因菌または菌血症原因菌が特定されることを特徴とする方法を提供する。

この方法を、様々なセプシスが疑われた患者血液の診断に実際に応用したところ、投与された抗菌薬の影響を受けることなく、血液培養法に比べて約4倍の感度で起因菌を検出することができ、検出菌株の一致率は良好であることが明らかになっている。そして、血液培養では検査に3日以上14日程度を要するのに比較して、本発明の方法では全操作完了までに約8時間と極めて短時間の簡便な操作によって正確な結果を得ることができるので、特に

敗血症または菌血症など、速やかな善処が必要とされる感染症の診断や予後診断のモニター等において有用マーカーとなり得る。

実施例

以下に、本発明を実施例に沿って具体的に説明するが、これら実施例の開示によって本発明が限定的に解釈されるべきでないことは勿論である。

実施例 1：採血・血液検体の処理

臨床検体として、敗血症が疑われた患者より採取した血液12検体（検体A～L）を用いた。各患者からヘパリン加静脈血10mlを採取し、これら血液と血液分離試薬（塩化ナトリウム225mg、デキストラン（分子量：200,000～300,000）1.5g、滅菌精製水にて全量25mlに調製したもの）を4：1の割合で混和した後、37℃で、30分間静置することにより、白血球画分（上層）を取得した。この白血球画分を、4℃にて160×gで10分間遠心分離することで、白血球を得た。次に、得られた白血球のペレットに滅菌精製水1mlを加えて懸濁し、直ちに過剰量のPBS（塩化ナトリウム18.24g、リン酸一水素ナトリウム12水和物6.012g、リン酸二水素ナトリウム2水和物1.123g、滅菌精製水にて全量120mlにしたもの（PBS原液）を、滅菌精製水にて20倍に希釈したもの）を加えて等張化した後、再度4℃で、160×gで10分間遠心分離した。

実施例 2：白血球の固定

3-アミノプロピルトリエトキシシラン（APS、SIGMA社）がスライドグラス（日本エアーブラウン社製、商品番号MS311BL）にコートされたAPSコートスライドグラスを使用した。APSコートスライドグラスの作製は、まず、スライドホルダーにスライドグラス（商品番号MS311BL）を固定した後、希釈した中性洗剤で30分以上浸すことにより洗浄し、水道水で洗剤を十分に除去し、次に、スライドグラスを精製水にて洗浄し、高温（100℃以上）で十分に乾燥させた後、室温で放置冷却した。その後、このスライドグラスを2%APS含有アセトンに1分間浸し、直ちにアセトン及び滅菌精製水で順次軽く洗浄した後、風乾した。さらに、再度、スライドグラスを2%APS含

有アセトンに1分間浸し、直ちにアセトン及び滅菌精製水で、順次軽く洗浄した後、風乾する操作を行った後、42℃で乾燥させることにより作製した。

白血球画分を、4℃にて、160×gで10分間遠心分離して得た白血球ペレットに、少量のPBSを加えて懸濁し、血球計算盤を用いて白血球数を計測する。細胞数が 1×10^5 個/ウェルとなるようにPBSで調製した白血球懸濁液5 μ lを、APSコートスライドガラスの各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し、完全に風乾することにより、白血球をAPSコートスライドガラスに支持させた。その後、カルノア固定液（エタノール：クロロホルム：酢酸＝6：3：1の容量比で混合した液）に20分間浸した後、75%エタノール液に5分間浸し、完全に風乾させた。

実施例3：白血球細胞膜の透過性亢進処理

PBSに10分間浸し、その後、酵素前処理試薬（サポニン1.25g、*t*-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（比重1.068～1.075（20/4℃）、pH（5w/v%）5.5～7.5）1.25ml、PBS原液25mlを混合し、滅菌精製水にて全量50mlに調製したもの）を滅菌精製水で10倍に希釈した溶液に浸し、振とう機で10分間浸透させた。

実施例4：菌体壁の溶菌酵素処理

感染症原因菌のDNAを露出させるため、スライドガラス1枚につき酵素試薬（N-アセチルムラミダーゼ1,000単位/ml、リゾチーム100,000単位/mlおよび/またはリゾスタフィン100単位/ml）に酵素試薬溶解液（PBSで0.1mol/lフェニルメチルスルフォニルフルオリド（PMSF）含有ジメチルスルフォキシド（DMSO）を100倍希釈して製したもの）を1ml加えて酵素試液を調製した後、37℃～42℃の湿潤箱内で、酵素試液1mlを白血球塗抹部位に滴下し、30分間静置した。その後、0.2mol/l塩酸含有PBS（PBS原液に塩酸を加え、滅菌精製水にて20倍希釈し、塩酸の終濃度を0.2mol/lに調製したもの）に浸し、そのまま振とう機上で10分間浸透させた。

実施例5：細胞膜タンパク質のアセチル化

アセチル化試薬（トリエタノールアミン7.46g、塩酸適量、滅菌精製水適

量にて全量50mlとしたもの)に無水酢酸を加え、滅菌精製水で10倍希釈し、無水酢酸の終濃度を0.8%に調製したアセチレーション試薬にスライドグラスを浸し、振とう機上で10分間振とうすることにより行った。その後、75%、85%、98%エタノールに、順次、3分間ずつ浸し、完全に風乾させた。

5 実施例 6：菌体DNAのアルカリ処理（二本鎖DNAを一本鎖に変性）

スライドグラスを、70mmol/l 水酸化ナトリウム含有PBS（PBS原液に水酸化ナトリウムを加え、滅菌精製水で20倍希釈し、水酸化ナトリウムの終濃度を70mmol/lに調製したもの）に3分間浸すことにより行った。その後、75%、85%、98%エタノールに、順次、3分間ずつ浸し、完全に風乾させた。

10 実施例 7：ハイブリダイゼーション

プローブ希釈液（0.25% SDS、サケ精子DNA 600 μ l、100 \times デンハート溶液 50 μ l、ハイブリダイゼーション原液500 μ l、ホルムアミド2250 μ l、50%硫酸デキストラン1000 μ lが含まれる）で調製したジゴキシゲニン標識DNA

- 15 プローブ15ngを含有する液（プローブ液；1.0ng/ μ l）を塗抹部位に塗布し、37 $^{\circ}$ C～42 $^{\circ}$ Cの湿潤箱中で2時間静置させた。SDS無添加のプローブ液を対照とした。ジゴキシゲニン標識DNAプローブは、ニックトランスレーション法にて作製した。その後、ハイブリダイゼーション洗浄液（ハイブリダイゼーション原液（塩化ナトリウム13.15g、クエン酸三ナトリウム2水和物6.615g、滅菌精製水にて全量75mlに調製したもの）を、ハイブリダイ
- 20 ゼーション原液：滅菌精製水：ホルムアミド＝5：45：50の割合で混合して調製したもの）を3つの染色ビンに用意し、順次、42 $^{\circ}$ Cで10分間ずつ浸した。

その後、PBSに浸して、そのまま振とう機上で10分間振とうさせた。ジゴキシゲニン標識DNAプローブとして、*Staphylococcus aureus*および

*Staphylococcus epidermidis*に対するプローブとして、SA-24（配列番号：1）、SA-36（配列番号：2）およびSA-77（配列番号：3）ならびにSE-22（配列番号：4）、SE-3（配列番号：5）およびSE-32（配列番号：6）（日本国特許第2798499号参照）の各プローブを利用した。また、*Pseudomonas aeruginosa*に対するプローブとして、P2-2（配列番号：7）（日本国特許第2965544

号参照) のプローブを利用した。 また、*Enterococcus faecalis* に対する
プローブとして、EF-1 (配列番号: 8)、EF-27 (配列番号: 9) およびEF-7
(配列番号: 10) (日本国特許第2965543号参照) を利用した。 そして、
Escherichia coli、*Enterobacter cloacae* および *Klebsiella pneumoniae* に
5 対するプローブとして、EC-24 (配列番号: 11)、EC-34 (配列番号: 12) お
よびEC-39 (配列番号: 13) ならびにET-49 (配列番号: 14) およびKI-50 (配
列番号: 15) (日本国特許第3026789号参照) を利用した。 さらに、*Candida*
albicans に対するプローブとして、CA-26 (配列番号: 16)、CA-26-1 (配列
番号: 17)、CA-26-2 (配列番号: 18) およびCA-26-3 (配列番号: 19) (日本
10 国特許第2558420号参照) を利用した。 これらプローブの配列を用いて、
ニックトランスレーション法によりプローブの作製を行った。

実施例 8 : ブロッキング

In situハイブリダイゼーションを行った後、ブロッキングの操作を行っ
た。 湿潤箱内でスライドガラス 1 枚につきブロッキング試薬 (ウサギ正常
15 血清 2 ml、PBS原液0.5ml、滅菌精製水にて全量10mlに調製したもの) 1 mlを
塗抹部位に滴下し、30分間静置した。 その後、ブロッキング試薬を除去し
た。

実施例 9 : 標識抗体との反応

標識抗体 (アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液1.05
20 単位、バッファーA (トリエタノールアミン746mg、塩化ナトリウム17.5mg、
塩化マグネシウム 6 水和物20.3mg、塩化亜鉛1.36mg、ウシ血清アルブミン
1000mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量100mlに調製したもの) 12.6 μ l
にて全量を14 μ lに調製したもの) を標識抗体希釈液 (トリス-(ヒドロキシ
メチル)-アミノメタン8.48mg、塩化ナトリウム6.14mg、塩酸適量、滅菌精製
25 水適量にて全量0.7mlに調製したもの) で50倍希釈した標識抗体液を調製し、
この標識抗体液を塗抹部位に10 μ lずつ滴下し、30分間静置させた。 その
後、標識抗体洗浄液 (ポリソルベート20 1 ml、PBS原液50ml、滅菌精製水に
て全量100mlに調製したもの) を10倍に希釈した溶液に浸して、そのまま振

とう機上で10分間浸透させた。この操作を2回繰り返した後、発色前処理液1（トリス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタン6.06 g、塩化ナトリウム2.92 g、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量50mlに調製したもの）と発色前処理液2（塩化マグネシウム6水和物5.08 g、滅菌精製水にて全量50mlに調製したもの）とを等量混合し、滅菌精製水で5倍に希釈した発色前処理液に浸し、そのまま振とう機上で10分間振とうさせた。

実施例10：検出

スライドガラス1枚につき発色試薬（ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)/5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト(BCIP)溶液、pH 9.0~10.0
10 : NBT 3.3mg、BCIP 1.65mg、N,N-ジメチルホルムアミド99 μ g、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン121mg、塩酸適量、塩化ナトリウム58.4mg、塩化マグネシウム6水和物101.6mg、滅菌精製水適量にて全量10mlに調製したもの) 1mlを0.2 μ mシリンジトップフィルターを装着したディスプレイブルシリンジを用いてろ過しながら、スライドガラスの塗抹部位に滴下し、湿潤箱
15 内で、37℃、30分間遮光静置した。その後、発色試薬洗浄液（トリス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタン606mg、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム2水和物186mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量50mlに調製したもの）を10倍に希釈した溶液に5分間浸し、風乾した後、対比染色液（ファストグリーンFCF(食用緑色3号)50mg、滅菌精製水適量にて全量50mlに調製したもの）を10倍に希釈した溶液および1%酢酸溶液に浸した。その後、前記発
20 色試薬洗浄液を10倍に希釈した溶液に再度浸して余分の前記対比染色液を洗い流し、完全に風乾させた。

実施例11：判定

判定は、光学顕微鏡で鏡検（ $\times 1,000$ ）するとき、単一ウェル内で対比染色液によって染まった細胞に於いて、青紫色の発色シグナルが1つでも認められた場合に陽性と判定した。その結果、本発明の方法により、12検体中5検体で菌を検出した。5検体の内訳は、検体A-SA (Staphylococcus aureus)、検体FおよびG-SE (Staphylococcus epidermidis)、検体J-SEおよ

びEF (Enterococcus faecalis)、検体L-SAおよびCA (Candida albicans) であった。なお、同じ検体を用いて、公知の方法に従い血液培養を行ったところ、検体AはSAを検出し同一の結果を示したが、検体F、G、JおよびLは菌を検出することができなかった。従って、本発明の方法が、血液培養
5 と比較して、迅速に感度よく検出できることが判明した。

検体A-SAにおける結果に関し、プローブ希釈液へのSDSの添加の効果を、第1図に示した。第1図から、SDSを0.25%添加することで、シグナルの検出感度が格段に高められることが明らかである。その他の検体についても同様に、SDSを添加することで良好なシグナル検出が可能となった。なお、本実施例において使用したプローブは、SA-24 (配列番号：1)、SA-36
10 (配列番号：2) およびSA-77 (配列番号：3) の塩基配列を組み合わせる用い、ニックトランスレーションによって作製したプローブである。

実施例12：塗抹固定する至適白血球数の検討

APSコートスライドガラスのウェル (直径5mmの円形ウェル) に塗抹する
15 至適白血球数を検討した。ヘパリン加健常ヒト血液10mlを採取し、実施例1に記載の手順に従って白血球を採取した。次に、得られた白血球を適量のPBSで懸濁した後、血球計算盤を用いて1ml当たりの白血球数を測定し、(a) 1×10^8 個/mlを始点として、(b) 5×10^7 個/ml、(c) 1×10^7 個/ml、(d) 5×10^6 個/ml、(e) 1×10^6 個/ml、(f) 5×10^5 個/mlおよび(g) 1×10^5 個/mlの希
20 釈系列を作成した後、各々5 μ lをスライドガラスに塗抹した。風乾後、カルノア固定 (実施例2参照) を行い、直ちに前記対比染色液で染色し、実施例11に記載した方法を用いて判定した。その結果、細胞数が 1×10^8 個/mlでは細胞数が過剰であり、検出不適であった。また、 5×10^6 個/ml以下では、ウェルに観察される細胞数が少なく、検出不適であった。よって、
25 固定化する食細胞の密度 (x 個/ml) としては、 5×10^6 個/ml < x 個/ml < 1×10^8 個/ml、とりわけ、 1×10^7 個/ml \leq x 個/ml \leq 5×10^7 個/mlが好ましい。また、それに対応して、APSコートスライドガラスに固定される1ウェル当たりの白血球の細胞数 (y 個/ウェル (直径5mm)) は、約 $2.5 \times$

10⁴個/ウェル<y個/ウェル(直径5mm)<約5×10⁵個/ウェル、好ましくは、約5×10⁴個/ウェル≤y個/ウェル(直径5mm)≤約2.5×10⁵個/ウェルとなるように調製するのが良いことが判明した。試料(a)～(f)に関する実験結果を、第2図(a)～(f)にそれぞれ示した。

5 実施例13：使用溶菌酵素の選択

Staphylococcus aureus (ATCC 12600)、Staphylococcus epidermidis (ATCC 14990)、Pseudomonas aeruginosa (ATCC 10145)、Enterococcus faecalis (ATCC 19433)、Escherichia coli (ATCC 11775)を溶菌する酵素条件を検討した。Staphylococcus aureusおよびStaphylococcus epidermidisでは、
10 溶菌酵素としてリゾスタフィン (Bur. J. Biochem., 38, 293-300, 1973) を使用した。Enterococcus faecalisには、N-アセチルムラミダーゼ (Archs. Oral Biol., 23, 543-549, 1978)、リゾチーム (生化学工業) を使用した。また、Pseudomonas aeruginosaおよびEscherichia coliについては、70mmol/lの水酸化ナトリウム含有PBSを使用した。これら各種細菌を5mlのBHI (ブレインハートインフュージョン) 液体培地(DIFCO社製)に
15 植菌し、37℃で8時間以上培養した。培養した菌液を、4℃、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。集めた菌をPBSで懸濁して試料とした。

溶菌はマイクロプレートリーダーを用い、吸光度600nmにおける菌液の濁度の減少により評価した。その結果、Staphylococcus aureusおよびStaphylococcus epidermidisは、リゾスタフィンにより溶菌した。Pseudomonas aeruginosaおよびEscherichia coliについては、70mmol/lの水酸化ナトリウム含有PBSで溶菌したため、酵素処理は必要としなかった。また、Enterococcus faecalisについては、N-アセチルムラミダーゼ単独よりもリゾチームと併用した方が優れた溶菌活性が得られることが判明した。また、食食作用を受けて取り込まれた菌が、例えば、Pseudomonas aeruginosaおよび
25 Escherichia coliなどである場合には、アルカリ処理に際して菌の細胞壁が溶解され、遺伝子が露出した状態となるので、必ずしもこの酵素処理を行う必要はない。本発明において外来微生物を溶解するために使用される前処

理用の各酵素は、前述した細菌株に対して有効であるのみならず、他のスタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、バシルス属およびマイクロコッカス属を初めとする他の菌種等でも有効である。 また、かような酵素は、各々単独で用いることもできるが、混合した場合の方が有効である。 それら

5 結果を、第3図、具体的には、(a) *Staphylococcus aureus*および*Staphylococcus epidermidis*、(b) *Pseudomonas aeruginosa*および*Escherichia coli*、ならびに(c) *Enterococcus faecalis*について示した。

実施例14：酵素溶解液に関する検討（DMSOの至適濃度の検討）

酵素試薬に含有されるプロテアーゼは、白血球の形態を劣化させることから、白血球の形態を保持させるために添加するPMSFの溶解剤であるDMSOの酵素活性に及ぼす影響を検討した。 *Enterococcus faecalis*を、50mlの前記BHI液体培地に植菌し、37℃で、8時間以上培養した。 この培養液を、4℃、2,000×gで10分間遠心分離して集菌し、PBSで懸濁した後、オートクレーブ（120℃、10分）により熱処理を行った。 次に、4℃、2,000×gで10

15 分間遠心分離し、上清を捨て、1mlのPBSで沈渣を懸濁させた後、凍結乾燥させた。 この凍結乾燥試料を0～10%DMSO含有5mmol/lトリス-塩酸（pH 6.0）、2mmol/l塩化マグネシウムで懸濁し、N-アセチルムラミダーゼに対する試料とした。 また、*Micrococcus luteus*（JCM1464）を、5mlのBHI液体培地（前出）に植菌し、37℃で8時間以上培養した。 培養した菌液を、4

20 ℃、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。 上清を捨て、菌のペレットをPBS 5mlで懸濁洗浄し、再度4℃、2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。 このようにして集めた菌を、0～10%DMSO含有PBSで懸濁し、リゾチームに対する試料とした。 一方、*Staphylococcus epidermidis*をリゾチームの場合と同様に培養、集菌し、0～10%DMSO含有PBSで懸濁し、リゾ

25 スタフィンに対する試料とした。 酵素活性は、マイクロプレートリーダーを用い、吸光度600nmにおける試料の濁度の減少により評価した。 ただし、本試験中それぞれの酵素力価は、(a) N-アセチルムラミダーゼ 300単位/ml、(b) リゾチーム 10,000単位/ml、(c) リゾスタフィン 50単位/mlとし、酵素

活性に対するDMSOの影響を検討した。それぞれの酵素活性を単位時間当たりにおける菌濁度（O.D. = 600nm）の減少で評価した結果、DMSOは、N-アセチルムラミダーゼ活性に対しては殆ど影響を与えなかったが、リゾチームおよびリゾスタフィンに対しては、共に5%以上のDMSOで活性の低下が認められた。また、2%以下のDMSOの濃度では、酵素活性の低下は認められなかった。ゆえに、PMSFを溶解させるDMSO濃度は少なくとも5%未満、好ましくは2%以下、さらには1%程度とするのが好ましい。その結果を、第4図(a)～(c)および下記表3に示した。

表3：酵素活性（菌濁度の減少）に対するDMSOの影響

DMSO 添加量(%)	N-アセチルムラミダーゼ O.D./5分間	リゾチーム O.D./3分間	リゾスタフィン O.D./10分間
0 (対照)	79.3±4.8	0.689±0.028	0.168±0.017
0.1	75.0±3.2	0.678±0.026	0.164±0.009
1	75.8±2.8	0.660±0.026	0.160±0.008
2	75.8±2.5	0.653±0.024	0.145±0.009
5	76.3±4.9	0.566±0.017	0.124±0.006
10	73.8±3.5	0.464±0.016	0.094±0.006

実施例15：酵素溶解液に関する検討（PMSFの至適濃度の検討）

10 酵素試薬に含有されるプロテアーゼは白血球の形態を劣化させることから、白血球の形態を保持させるために添加するPMSF（PIERCE社製）の効果を検討した。100 μ lのDMSO（和光純薬社製）にPMSFを溶解し、PMSFの終濃度が無添加（0 mmol/l）～1 mmol/lとなるようにPBSで10mlに希釈した。この溶液に、プロテアーゼの力価が0.2単位/mlとなるよう、プロテイナーゼK（ベ

15 ーリンガーマンハイム社製）を添加した。ヘパリン加健常ヒト血液5mlを採取し、実施例1に記載の方法に従って白血球を採取した。次に、白血球を適当量のPBSで懸濁して、血球計算盤で細胞数を計測し、細胞数を、約5 $\times 10^4$ 個/ウェル～約2.5 $\times 10^5$ 個/ウェルに調製し、その5 μ lをAPSコートス

ライドガラスのウェルに塗抹し、風乾後、実施例2に記載のカルノア固定の方法に従って固定した。このサンプルを用いて、実施例3～11に記載の方法に従って試験を行った。1 $\mu\text{mol/l}$ ～1 mmol/l のPMSFの濃度で試験を実施した結果、10 $\mu\text{mol/l}$ 以上の濃度で効果が認められ、0.1 mmol/l 以上のPMSF
5 濃度では、白血球の形態の劣化が完全に抑制されていた。その結果を、第5図の(a) プロテアーゼ0.2単位/mlのみ、(b) PMSF 1 $\mu\text{mol/ml}$ 添加、(c) PMSF 10 $\mu\text{mol/ml}$ 添加、(d) PMSF 0.1 mmol/ml 添加、および(e) PMSF 1 mmol/ml 添加についてそれぞれ示した。

実施例16：溶菌酵素ザイモラーゼの至適力価の検討

10 カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) を溶菌してDNAを露出させるためのザイモラーゼの至適力価を検討した。カンジダ・アルビカンスをYPD培地に植菌し、30℃で一昼夜培養した。その後、基質としてカンジダ・アルビカンスをPBSで懸濁した溶液（基質1）、およびカルノア固定後、70%エタノールに浸し、風乾し、PBSにて懸濁した溶液（基質2）の2種類を
15 調製した。反応は、ザイモラーゼ/PBS：0.5ml、基質：1.5ml、M/15リン酸緩衝液：2.5ml、滅菌精製水：0.5mlにて全量5.0mlに調製したものをを用いた。

その後、37℃で、2時間反応させ、そのOD₈₀₀を測定した。また、ザイモラーゼ（ザイモリエイス-100T）濃度は、0 mg/ml、0.01 mg/ml、0.025 mg/ml、0.05 mg/ml、0.1 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、2.5 mg/ml、5
20 mg/mlを用いた。その結果、基質1を用いた場合のそれぞれのOD₈₀₀値は、0.533、0.521、0.553、0.554、0.548、0.417、0.394、0.288、0.163、0.113であり、また、基質2を用いた場合のそれぞれのOD₈₀₀値は、0.445、0.411、0.359、0.282、0.232、0.146、0.115、0.096、0.08、0.057であった。基質1および基質2がともに、0.5 mg/ml～5 mg/ml、特に、1 mg/ml～5 mg/ml
25 の範囲で有効であることが判明した。すなわち、ザイモラーゼの使用量は、50単位/ml～500単位/ml、特に100単位/ml～500単位/mlであることが好ましい。

実施例17：至適酵素処理条件（力価）の検討(1) 食食サンプルの作製① U937細胞の調製

- 37℃、5 %炭酸ガスインキュベーター内で、細胞培養フラスコ（175cm²）
5 中のRPMI1640培地（25ml）でU937細胞（ヒト単球株化細胞、ATCC CRL-1593、
2) を培養した。次に、U937細胞培養液を50mlの遠沈管に入れ、4℃、
220×gで10分間遠心分離し、U937細胞を回収した。その後、回収した
U937細胞をPBS200μlで懸濁し、血球計算盤で細胞数を計算し、細胞数を1
×10⁴個/μl～2×10⁴個/μlに調製した。

② 細菌食食サンプルの調製

- Staphylococcus aureus (ATCC 12600)、Staphylococcus epidermidis (AT
CC 14990)、Pseudomonas aeruginosa(ATCC 10145)、Enterococcus faecalis
(ATCC 19433)およびEscherichia coli (ATCC 11775) を、各々5mlのBHI培
養液に植菌し、37℃で8時間以上培養した。培養した菌液を、4℃、
15 2,000×gで10分間遠心分離して集菌した。上清を捨てた後、菌のペレッ
トをPBS 5mlで懸濁し、再度、4℃、2,000×gで10分間遠心分離して集菌
した。集菌した菌をPBS 5mlで懸濁した後、PBSにて希釈して吸光度計によ
り菌液の濁度（O.D.=600nm）を、Staphylococcus aureus (0.01～0.03)、
Staphylococcus epidermidis (0.01～0.03)、Pseudomonas aeruginosa
20 (0.02～0.03)、Enterococcus faecalis (0.01～0.03)、Escherichia coli
(0.02～0.03) にそれぞれ調製したものを15ml作製した。作製した菌液は、
個別の175cm²の培養用フラスコに移し、30分間室温で静置した。ヘパリン
加健常ヒト血液50mlを採取し、血球分離試薬を4：1の割合で加え、37℃で
30分間静置し、白血球画分を分取した。分取した白血球画分をPBSで50ml
25 にした。培養用フラスコ（前出）の上清を静かに捨て、PBSで希釈した白
血球画分を10mlずつフラスコに加え、室温で10分間静置した。培養用フラ
スコ内の上清を捨て、フラスコの底に付着した白血球を0.02%EDTA含有PBS
10mlで15mlの遠沈管に回収し、4℃、140×g～180×gで10分間遠心分離し、

白血球を収集した。収集した白血球中に赤血球の混入が認められたので、滅菌精製水 1 ml にて白血球の沈渣を穏やかに懸濁して溶血させた後、PBS を 14 ml 加えて等張化を行い、再度 4℃、 $140 \times g \sim 180 \times g$ で 10 分間遠心分離を行い、白血球を収集した。収集した白血球を PBS で懸濁し、血球計算盤に
5 て細胞数を計測し、 1×10^4 個/ μ l $\sim 5 \times 10^4$ 個/ μ l に調製した。この食食サンプルを、それぞれ SA 食食サンプル、SE 食食サンプル、PA 食食サンプル、EF 食食サンプル、EK 食食サンプルとした。

③ 塗抹固定

実施例 17(1)①で調製した U937 細胞と、実施例 17(1)②で作製した各細菌
10 食食サンプルとを APS コートスライドガラスの各ウェルに 5 μ l ずつ塗抹し、風乾させた。次に、実施例 2 に記載のカルノア固定液に 20 分間浸した後、75% エタノールに 5 分間浸し、カルノア固定液を洗浄して風乾させた後、試験に使用するまで 4℃ で保存した（実施例 2 参照）。次いで、固定サンプルの前処理を、実施例 3 に従って行った。

15 (2) 食食サンプルの規格及び試験方法

① 細胞数

各細菌食食サンプルのスライドガラスに塗抹固定する細胞の数を、 $5.0 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ 個/ウェルとし、また、U937 細胞の細胞の数を $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 個/ウェルとした。

20 ② 食食率

スライドガラスに塗抹固定した細菌食食サンプルを、アクリジンオレンジ染色液で染色し、蛍光顕微鏡（ $\times 1,000$ ）で無作為に約 200 個の細胞を計測した。計測した細胞の中で、細胞内に細菌を食食している細胞（第 6 図で矢印にて示す、食食に特徴的な形態変化が認められた細胞）を陽性細胞とし、
25 以下の数式に従ってその食食率（%）を算出した。

$$\text{食食率（\%）} = \left[\left(\text{陽性細胞数} / \text{計測細胞数} \right) \times 100 \right]$$

この時に算出した各細菌食食サンプルの食食率（%）は、10% 以上であった。

③ 試験方法

実施例17(2)①および②で作成した食食サンプルを検体とした。 使用したSA食食サンプルの食食率は23%であり、 1.98×10^5 個/ウェルであった。

SE食食サンプルの食食率は27%であり、 1.74×10^5 個/ウェルであった。 ま

5 た、EF食食サンプルの食食率は34%であり、 6.40×10^4 個/ウェルであった。

各食食サンプルを塗抹したスライドグラスを用いて、実施例3に記載の方法に従って、酵素前処理を行った。 次に、酵素前処理済みのスライドグラスを湿潤箱に置き、各種力価に調製した各酵素溶液1mlを検体塗抹部位に滴下して反応させた。 その後、0.2mol/l塩酸含有PBS、70%エタノールにそ

10 れぞれ10分間浸し、風乾させた。 このスライドグラスを、70mmol/l水酸化ナトリウム含有PBSに3分間、70%エタノールに10分間浸した後に風乾し、

1%アクリジンオレンジ染色液で染色した。 その後、蛍光顕微鏡($\times 1,000$)により評価した。 *Staphylococcus aureus*および*Staphylococcus epidermidis*は、リゾスタフィンで至適力価の検討を行った。 *Enterococcus*

15 *faecalis*は、N-アセチルムラミダーゼとリゾチームの併用で至適力価を検討するため、N-アセチルムラミダーゼを100単位/mlに固定した場合のリゾチーム至適力価の検討と、リゾチームを10,000単位/mlに固定した場合のN-アセチルムラミダーゼ至適力価の検討を行った。 判定は、酵素処理により菌体が白血球中に確認されなくなるとき「適」とした。

20 ④ 結 果

*Staphylococcus aureus*の溶菌においては、表4に記載のように、リゾスタフィンの力価は1単位/mlで十分効果を示すが、*Staphylococcus epidermidis*の溶菌においては、10単位/ml以上のリゾスタフィン力価が必要であった。 ゆえに、リゾスタフィンの至適力価を、10単位/ml~100単位/mlに設定した。

25 また、*Enterococcus faecalis*の溶菌においては、リゾチームの力価を10,000単位/mlで固定したとき、N-アセチルムラミダーゼ力価が10単位/ml以下では溶菌されなかった。 リゾチームについては、表5に記載の通り、N-アセチルムラミダーゼ力価を100単位/mlに固定したとき、リゾチーム力価が

- 1,000単位/ml以下では溶菌されなかった。 ゆえに、N-アセチルムラミダーゼの至適力価は、100単位/ml～1,000単位/ml、また、リゾチームの至適力価は、10,000単位/ml～100,000単位/mlに設定した。 その結果を、第7図に示すが、図中、(a)は酵素処理前の*Staphylococcus aureus*の食食サンプル、
- 5 (b)は処理前の*Enterococcus faecalis*の食食サンプル、(c)はサンプル(a)を酵素処理した後、および(d)はサンプル(b)を酵素処理した後の様子を示している。

表4 : *S. aureus*、*S. epidermidis*に対する
リゾスタフィンの至適酵素処理力価

リゾスタフィン力価 (U/mL)		0	0.1	1	10	100	1,000
食食サンプル							
S A 食食サンプル	1 回	不適	不適	適	適	適	適
	2 回	不適	不適	適	適	適	適
	3 回	不適	不適	適	適	適	適
S E 食食サンプル	1 回	不適	不適	不適	適	適	適
	2 回	不適	不適	不適	適	適	適
	3 回	不適	不適	不適	適	適	適

表5 : *E. faecalis*に対するN-アセチルムラミダーゼおよび
リゾチームの至適酵素処理力価

N-アセチルムラミダーゼ力価 (U/mL)		0	1	10	100	1,000	10,000
食食サンプル							
E F 食食サンプル	1 回	不適	不適	不適	適	適	適
	2 回	不適	不適	不適	適	適	適
	3 回	不適	不適	不適	適	適	適
リゾチーム力価 (U/mL)		0	10	100	1,000	10,000	100,000
食食サンプル							
E F 食食サンプル	1 回	不適	不適	不適	不適	適	適
	2 回	不適	不適	不適	不適	適	適
	3 回	不適	不適	不適	不適	適	適

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における上記各酵素の至適力価も同一とした。

実施例18：至適酵素処理条件（温度）の検討

- 5 各食食サンプルを塗抹したスライドガラスを用いて、実施例17(2)③に記載の方法に準じて検討した。ただし、本試験の酵素処理時間は30分、検討温度は4℃、25℃、37℃、42℃、60℃とし、また、各酵素力価は、N-アセチルムラミダーゼ（100単位/ml、生化学工業社製）、リゾチーム（10,000単位/ml、生化学工業社製）、リゾスタフィン（10単位/ml、SIGMA社製）とした。
- 10 判定は、実施例17(2)③に記載の方法に準じて行った。その結果、*Staphylococcus aureus*は、4℃～60℃の温度範囲で白血球の菌体は確認されなかった。*Staphylococcus epidermidis*は、処理温度4℃および25℃では白血球中の菌体が残存していたが、37℃以上では菌体を確認されなかった。
- また、*Enterococcus faecalis*では、処理温度4℃、25℃および60℃で菌
- 15 体が残存していたが、37℃および42℃では確認されなかった。ゆえに、至適酵素処理温度を37℃～42℃に設定した。その結果を、表6に示した。

表6：酵素試薬の至適処理温度

処理温度（℃）		4	25	37	42	60
食食サンプル	S A 食食サンプル	1 回	適	適	適	適
		2 回	適	適	適	適
		3 回	適	適	適	適
	S E 食食サンプル	1 回	不適	不適	適	適
		2 回	不適	不適	適	適
		3 回	不適	不適	適	適
	E F 食食サンプル	1 回	不適	不適	適	不適
		2 回	不適	不適	適	不適
		3 回	不適	不適	適	不適

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における酵素処理の至適温度も同一とした。

実施例19：至適酵素処理条件（時間）の検討

- 5 実施例17(1)①および②に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。検討した時間は、0分、10分、20分、30分、60分、120分とした。使用したSA食食サンプルの食食率は18%であり、 7.80×10^4 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は34%であり、 1.10×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は28%であり、 1.30×10^5 個/ウェルであった。
- 10 各食食サンプルを塗抹したスライドグラスを用いて、実施例17(2)③に記載の方法に準じて検討した。但し、本試験の酵素処理温度は37℃、各酵素力価はN-アセチルムラミダーゼ（100単位/ml）、リゾチーム（10,000単位/ml）、リゾスタフィン（10単位/ml）とした。判定は、実施例17(2)③に記載の方法に準じて行った。その結果、Staphylococcus aureus、Staphylococcus
- 15 epidermidis、Enterococcus faecalis食食サンプルともに酵素処理時間20分以上（0分および10分においては不適であった）で、白血球中に菌体は確認されなかったことから、少なくとも15分以上、好ましくは20分以上、さらに至適酵素処理時間を30分～60分とするのが好ましい。その結果を、表7に示した。

表 7 : 酵素試薬の至適処理時間

酵素処理時間 (分)		0	10	20	30	60	120
食食サンプル							
S A 食食サンプル	1 回	不適	不適	適	適	適	適
	2 回	不適	不適	適	適	適	適
	3 回	不適	不適	適	適	適	適
S E 食食サンプル	1 回	不適	不適	適	適	適	適
	2 回	不適	不適	適	適	適	適
	3 回	不適	不適	適	適	適	適
E F 食食サンプル	1 回	不適	不適	適	適	適	適
	2 回	不適	不適	適	適	適	適
	3 回	不適	不適	適	適	適	適

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における酵素処理の至適時間も同一とした。

実施例20：プローブ濃度の検討

- 5 本発明のin situハイブリダイゼーション反応において、プローブ濃度はハイブリッド形成速度に影響を与える主要な因子である。プローブ濃度が低すぎると反応速度の低下を招き、シグナルが明確でなくなる可能性がある。また、過剰量のプローブの使用は、非特異的反応の原因に繋がる。

- ゆえに、各種プローブ液について、至適濃度を検討した。まず、実施例
- 10 17(1)①および②に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。使用したSA食食サンプルの食食率は24%であり、 1.48×10^5 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は28%であり、 2.07×10^5 個/ウェルであった。PA食食サンプルの食食率は11%であり、 1.59×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は24%であり、 1.72×10^5 個/ウェルであった。EK
- 15 食食サンプルの食食率は12%であり、 1.63×10^5 個/ウェルであった。各食食サンプルを塗抹したスライドガラスを用いて、実施例17(2)③に記載の方法に準じて検討した。プローブは、ジゴキシゲニン標識したものを使用し、

Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Enterococcus faecalis、Pseudomonas aeruginosa、Escherichia coliに対する各プローブ濃度を、それぞれ、 $0.06\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.6\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $1.2\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $1.8\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $2.4\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $3\text{ng}/\mu\text{l}$ に調製した。 食食サンプルを塗抹したスライドガラス（第8図参照）に、上記各種濃度に調製したプローブ液を使用し、実施例3～11に記載の方法に従い検討した。

その結果、低濃度（ $0.06\text{ng}/\mu\text{l}$ ）ではシグナルが明確でなくなり、一方で、高濃度（ $2.4\text{ng}/\mu\text{l}$ および $3\text{ng}/\mu\text{l}$ ）ではバックグラウンドの増大が認められた。 ゆえに、SA、SE、PA、EF、EKのプローブ濃度を $0.6\sim 1.8\text{ng}/\mu\text{l}$ 、好ましくは $0.6\sim 1.2\text{ng}/\mu\text{l}$ とした。 また、 $0.06\text{ng}/\mu\text{l}$ においては不適であり、 $0.6\text{ng}/\mu\text{l}$ においては適であったことから、少なくとも $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ 以上とするのが好ましい。

さらに、 $2.4\text{ng}/\mu\text{l}$ においては不適であり、 $1.8\text{ng}/\mu\text{l}$ においては適であったことから、 $2.2\text{ng}/\mu\text{l}$ 以下とするのが好ましい。 その結果を、以下の表8～表12に示した。

表8：SAプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
SA食食サンプル	—	+	+	+	+	+
SE食食サンプル	—	—	—	—	+	+
PA食食サンプル	—	—	—	—	+	+
EF食食サンプル	—	—	—	—	+	+
EK食食サンプル	—	—	—	—	+	+

表 9 : S Eプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 (n g / μ L)					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
S A 食食サンプル	—	—	—	—	—	+
S E 食食サンプル	—	+	+	+	+	+
P A 食食サンプル	—	—	—	—	—	+
E F 食食サンプル	—	—	—	—	—	+
E K 食食サンプル	—	—	—	—	—	+

表 10 : P Aプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 (n g / μ L)					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
S A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
S E 食食サンプル	—	—	—	—	+	+
P A 食食サンプル	—	+	+	+	+	+
E F 食食サンプル	—	—	—	—	—	+
E K 食食サンプル	—	—	—	—	—	+

表 11 : E Fプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 (n g / μ L)					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
S A 食食サンプル	—	—	—	—	—	+
S E 食食サンプル	—	—	—	—	+	+
P A 食食サンプル	—	—	—	—	+	+
E F 食食サンプル	—	+	+	+	+	+
E K 食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 12 : E Kプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 (n g / μ L)					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
S A 食食サンプル	—	—	—	—	+	+
S E 食食サンプル	—	—	—	—	+	+
P A 食食サンプル	—	—	—	—	+	+
E F 食食サンプル	—	—	—	—	+	+
E K 食食サンプル	—	+	+	+	+	+

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における上記各プローブの至適濃度も同一とした。

実施例21：ハイブリダイゼーション温度の検討

- 5 ハイブリダイゼーション反応における反応温度は、ハイブリッド形成速度とハイブリッドの安定性に影響を与えるパラメーターである。ハイブリダイゼーション反応を高温にすると細胞の形態が劣化することが知られていることから、至適温度の検討（4℃、25℃、37℃、42℃、50℃、60℃）を行った。
- 10 まず、実施例17(1)①および②に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。使用したSA食食サンプルの食食率は31%であり、 1.38×10^5 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は42%であり、 1.95×10^5 個/ウェルであった。PA食食サンプルの食食率は14%である、 1.27×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は48%であり、 1.05×10^5 個/
- 15 ウェルであった。EK食食サンプルの食食率は17%であり、 1.85×10^5 個/ウェルであった。

食食サンプルおよびU937細胞を塗抹固定したスライドガラス（第9図参照）を使用して、実施例3～11に記載の方法に従い検討した。その結果、ハイブリダイゼーション温度が4℃以下ではハイブリッド形成速度が低下

20 し、各種プローブで安定なシグナルが観察されなかった。また、60℃においては細胞形態の変化が認められ、安定なシグナルが観察されなかった。

また、25℃および50℃では37℃および42℃に比べ、シグナルが明確でなかったが検出することは可能であった。ゆえに、至適ハイブリダイゼーションの温度は、25℃～50℃、より好ましくは37～42℃に設定すると良い。それら結果を、以下の表13～表17に示した。

25

表 13 : S Aプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
S A 食食サンプル	—	+	+	+	+	+
S E 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
P A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E F 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E K 食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 14 : S Eプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
S A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
S E 食食サンプル	—	+	+	+	+	—
P A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E F 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E K 食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 15 : P Aプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
S A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
S E 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
P A 食食サンプル	—	+	+	+	+	—
E F 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E K 食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 16 : E Fプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
S A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
S E 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
P A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E F 食食サンプル	+	+	+	+	+	—
E K 食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 17 : EKプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
SA食食サンプル	—	—	—	—	—	—
SE食食サンプル	—	—	—	—	—	—
PA食食サンプル	—	—	—	—	—	—
EF食食サンプル	—	—	—	—	—	—
EK食食サンプル	—	+	+	+	+	—

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定におけるハイブリダイゼーションの至適温度も同一とした。

実施例22：ハイブリダイゼーション時間の検討

- 5 実施例17(1)①および②に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とし、10分、60分、90分、120分、180分、900分間のハイブリダイゼーション時間について検討した。使用したSA食食サンプルの食食率は47%であり、 1.45×10^5 個/ウェルであった。SE食食サンプルの食食率は47%であり、 1.33×10^5 個/ウェルであった。PA食食サンプルの食食率は15%である、 1.91×10^5 個/ウェルであった。また、EF食食サンプルの食食率は41%であり、 1.45×10^5 個/ウェルであった。EK食食サンプルの食食率は20%であり、 1.23×10^5 個/ウェルであった。

食食サンプルおよびU937細胞を塗抹固定したスライドガラス（第9図に示すものに同じ）を使用して、実施例3～11に記載の方法に従い検討した。

- 15 その結果、ハイブリダイゼーション時間が10分ではシグナルが観察されなかったが、60分以上でシグナルが観察され、90分以上で安定したシグナルが観察された。また、ハイブリダイゼーション時間が900分においてもシグナルの検出には変化は認められなかった。ゆえに、少なくとも30分以上、好ましくは60分以上、より好ましくは90分以上とするのが好ましい。さらに好ましい至適ハイブリダイゼーション時間は、120分～900分に設定すると良い。それら結果を、以下の表18～表22に示した。

表 18 : S Aプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
S A食食サンプル	—	+	—	+	+	+
S E食食サンプル	—	—	—	—	—	—
P A食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E F食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E K食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 19 : S Eプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
S A食食サンプル	—	—	—	—	—	—
S E食食サンプル	+	+	+	+	+	+
P A食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E F食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E K食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 20 : S Eプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
S A食食サンプル	—	—	—	—	—	—
S E食食サンプル	—	—	—	—	—	—
P A食食サンプル	—	+	+	+	+	+
E F食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E K食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 21 : E Fプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
S A食食サンプル	—	—	—	—	—	—
S E食食サンプル	—	—	—	—	—	—
P A食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E F食食サンプル	+	+	+	+	+	+
E K食食サンプル	—	—	—	—	—	—

表 2 2 : E K プローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
S A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
S E 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
P A 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E F 食食サンプル	—	—	—	—	—	—
E K 食食サンプル	—	+	+	+	+	+

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定におけるハイブリダイゼーションの至適時間も同一とした。

実施例23：ハイブリダイゼーション溶液に添加する界面活性剤の影響

- 5 実施例17(1)①および②に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。プローブ希釈液に各種界面活性剤（SDS、ラウリスサルコシン、サポニン、BRIJ35、Tween 20、Triton X-100）を添加し、実施例7に従ってハイブリダイゼーションを行ったところ、0.25%のSDSを添加することにより検出感度が飛躍的に増強された。また、ラウリルサルコシン、BRIJ 35、ツ
- 10 イーン20（Tween 20）によって検出感度を高めることができた。その結果を、以下の表23に示した。

表 2 3

界面活性剤	シグナル検出
無添加	+
SDS	+++
ラウリルサルコシン	++
サポニン	+
BRIJ 35	++
Tween 20	++
Triton X-100	+

さらに、SDSを種々の濃度で用いた結果、好ましい濃度は、1%以下、より好ましくは0.1%~0.5%、さらに好ましくは0.25%であることが明らかになった。

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明においてもin situハイブリダイゼーションの工程に界面活性剤、特に、SDSを添加するのが好ましい。

実施例24：ハイブリダイゼーションの際に使用するプローブ鎖長の検討

Staphylococcus aureusプローブ (SA-24 (配列番号：1))およびPseudomonas aeruginosaプローブ (P2-2 (配列番号：7))を、ジゴキシゲニンでラベル化した。

まず、精製した各種DNAプローブ1 μ gを、10 \times L.B. (0.5mol/l トリス塩酸 (pH 7.5) 5 μ l、50mmol/l 塩化マグネシウム、0.5mgウシ血清アルブミン) 5 μ l、100mmol/l ジチオスレイトール 5 μ l、dNTPs (A、G、C) 各1 nmol、ジゴキシゲニン-dUTP (Dig-dUTP) 0.5nmol、dTTP各0.5nmol、DNase 3 μ l (25mU、75mUおよび200mU相当量)、10U/ μ l DNAポリメラーゼ1 μ lおよび滅菌精製水適量にて全量50 μ lとなるように調製した。15 $^{\circ}$ C、2時間でジゴキシゲニンラベル化を行った。ラベル化後、5分間煮沸し反応を停止させた。反応停止液をスピンカラム (CENTRI-SEP COLUMNS CS901、PRINCETON SEPARATIONS, INC.) に注入し、25 $^{\circ}$ Cで2分間遠心分離 (3,000 \times g) を行い、遊離のヌクレオチドを除去した。その後、溶出液の濃度を吸光度計により測定し、3%アガロースゲルにて電気泳動しサイズを確認した。

次に、サザンブロットィング法によりアガロースゲル内のDNAをニトロセルロース膜に転写させた。その後、2%ブロッキング試薬 (ロシュ社製) に30分間浸した後、1/5,000量のアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を加え、30分間浸した。次に、100mmol/lのトリス塩酸 (pH 7.5)、150mmol/l 塩化ナトリウムにて10分間振とうし、2回洗浄した。その後、100mmol/lのトリス塩酸 (pH9.5)、150mmol/l 塩化ナトリウムにて10分間振とうして洗浄した。その後、NBT/BCIP溶液に浸して発色させた。

最後に、精製水に浸し発色を止めて乾燥させた。その結果、第10図の(a) SAプローブ使用時および(b) PAプローブ使用時についてそれぞれ示すように、25mUのDNase（図中、レーン1）を用いて、その鎖長が、主として約350～約600塩基長に分布するように切断した場合に、ラベル効率が高いことが示された。こうして得られた検出用プローブを、食食サンプルや感染症患者からの臨床検体を用いた本発明の感染症原因微生物の検出方法において使用し、ハイブリダイゼーションを行ったところ、優れた感度でシグナルが検出された。従って、ハイブリダイゼーションに使用するプローブの鎖長は、約350～約600の塩基長、好ましくは、約350～約550の塩基長とすることが良いものと判明した。

実施例25：ハイブリダイゼーションの際に使用するプローブの検討

実施例17(1)①および②に記載の方法で作成した、*Escherichia coli*の食食サンプルを検体として、検出用プローブについての検討を行った。

検出用プローブは、EC-24（配列番号：11）、EC-34（配列番号：12）およびEC-39（配列番号：13）から、実施例24に記載したようにジゴキシゲニンラベル化し、約350～約600塩基長を有するように調製したものを、それぞれ単独または3種を組み合わせ使用した。得られた結果から、第11図に示すとおり、(a)EC-24、(b)EC-34または(c)EC-39のそれぞれを単独で検出用プローブとして用いるよりも、(d)これらを混合してなる混合プローブ「MIX」の方がシグナルが明瞭に検出され、感度が高められることが明らかであった。

産業上の利用可能性

本発明の方法におけるin situハイブリダイゼーションは、2時間以下でも安定なシグナルを観察することができるので、評価判定を非常に迅速に得ることができる。このような時間短縮は、敗血症の迅速な診断に適用する価値を実証するものに他ならない。

請 求 の 範 囲

1. 生体由来の食細胞を含む臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定し、該食細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在
- 5 すると予想される感染症原因微生物のDNAを露出させる処理を施し、該露出DNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションできる検出DNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより感染症原因微生物を検出および／または同定するための方法であって、以下の特徴(1)～(8)、すなわち；
- 10 (1) 固定化する食細胞の密度 (x 個/ml) が、 5×10^6 個/ml $< x$ 個/ml $< 1 \times 10^8$ 個/ml であること、
- (2) 前記DNAを露出させる工程においてリゾスタフィンが使用され、その力価が、1 単位/ml～1,000 単位/ml であること、
- (3) 前記DNAを露出させる工程においてリゾチームが使用され、その
- 15 力価が、1,000 単位/ml～1,000,000 単位/ml であること、
- (4) 前記DNAを露出させる工程においてN-アセチルムラミダーゼが使用され、その力価が、10 単位/ml～10,000 単位/ml であること、
- (5) 前記DNAを露出させる工程においてザイモラーゼが使用され、その力価が、50 単位/ml～500 単位/ml であること、
- 20 (6) 前記in situハイブリダイゼーションの工程において界面活性剤を使用すること、
- (7) 前記検出用DNAプローブが、350～600塩基長の鎖長を有する1種以上のDNAプローブであること、および
- (8) 前記検出用DNAプローブの濃度が、 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ～ $2.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ である
- 25 ことの少なくとも1つ以上の特徴を有する、
- ことを特徴とする、感染症原因微生物を検出および／または同定するための方法。

2. 前記DNAを露出させる工程において、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼおよびザイモラーゼより選択される1以上の酵素が使用され、そして、リゾスタフィンの力価が10単位/ml~100単位/ml、リゾチームの力価が10,000単位/ml~100,000単位/ml、N-アセチルムラミダーゼの力価が100単位/ml~1,000単位/ml、ザイモラーゼの力価が100単位/ml~500単位/mlである請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 前記DNAを露出させる工程において、酵素が使用され、そして、該酵素を反応させる温度が26℃~59℃であり、該酵素を反応させる時間が15分~120分である請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

4. 前記DNAを露出させる工程において、さらに食細胞の形態を保持させる物質を使用する請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかに記載の方法。

5. 前記食細胞の形態を保持させる物質が、フェニルメチルスルフォニルフルオリドである請求の範囲第4項に記載の方法。

6. 前記フェニルメチルスルフォニルフルオリドが、 $10\mu\text{mol/l}$ ~ 10mmol/l の濃度で使用される請求の範囲第5項に記載の方法。

7. 前記食細胞の形態を保持させる物質が、ジメチルスルフォキシドにて溶解された物質である請求の範囲第4項乃至第6項のいずれかに記載の方法。

8. 前記食細胞の形態を保持させる物質が、ジメチルスルフォキシドにて溶解された物質であり、また、当該ジメチルスルフォキシドが、前記DNAを露出させる工程で用いられる溶液において5%未満の濃度に調製される請求の範囲第7項に記載の方法。

5

9. 前記in situハイブリダイゼーションの工程において、DNAとDNAプローブとが、界面活性剤の存在下でハイブリダイズされる請求の範囲第1項乃至第8項のいずれかに記載の方法。

10. 前記界面活性剤が、アニオン界面活性剤である請求の範囲第9項に記載の方法。

11. 前記アニオン界面活性剤が、ドデシル硫酸ナトリウムである請求の範囲第10項に記載の方法。

15

12. 前記in situハイブリダイゼーション工程において、ハイブリダイズ反応させる温度が25℃～50℃であり、反応させる時間が30分～900分である請求の範囲第1項乃至第11項のいずれかに記載の方法。

13. 前記固定工程の前に、得られた食細胞を支持担体上に支持させる工程を含み、当該支持担体が、3-アミノプロピルトリエトキシシランをコートしたスライドグラスである請求の範囲第1項乃至第12項のいずれかに記載の方法。

14. 前記シグナルの検出の際に、シグナルと細胞のコントラストを明確にさせるための色素が使用される請求の範囲第1項乃至第13項のいずれかに記載の方法。

15. 前記臨床検体が、血液である請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の方法。

16. 食細胞を含む生体由来の臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞
5 を固定し、該食細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在すると予想される感染症原因微生物のDNAを露出させる処理を施し、該DNAにストリンジェントな条件下ハイブリダイゼーションすることのできる検出用DNAプローブを用いて界面活性剤の存在下にin situハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより感染症原因微生物を検出およ
10 び／または同定するためのキットであって、

(1) 前記DNAを露出させる工程において使用される酵素が、少なくとも、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼ、ザイモラーゼからなる群より選択される1種以上の酵素を含み、および

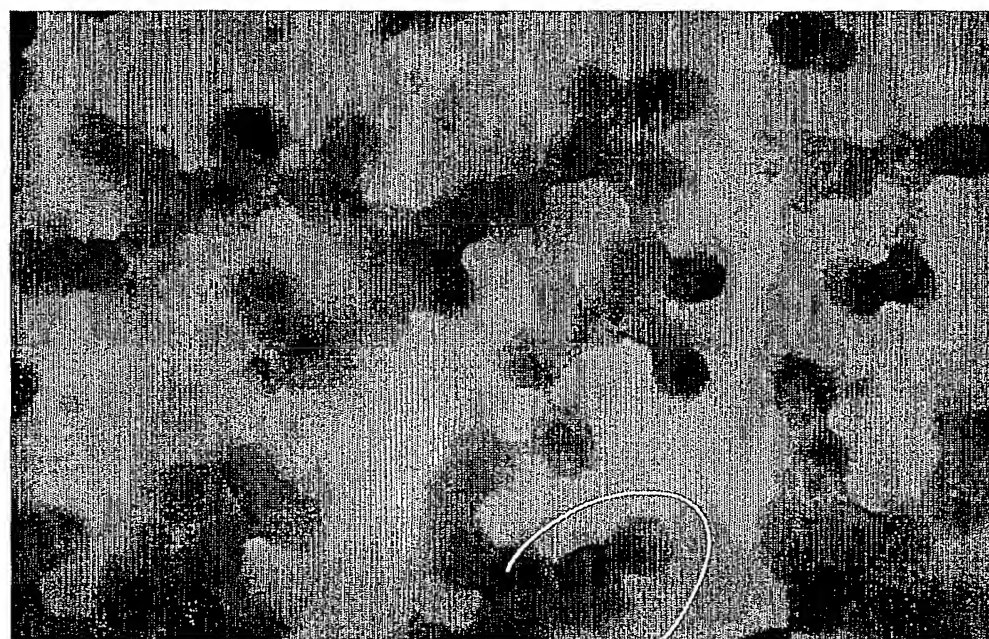
(2) 少なくとも1種以上の検出用DNAプローブを含む、
15 ことを特徴とする、感染症原因微生物を検出および／または同定するためのキット。

17. 生体由来の食細胞を含む臨床検体中に含まれる、食細胞によって貪食された外来微生物の遺伝子をモニターする方法であって、請求の範囲第1
20 項乃至第15項のいずれかに記載の方法におけるin situハイブリダイゼーション法を用いて該遺伝子を検出する工程を含み、該臨床検体中の外来微生物の遺伝子がモニターされることを特徴とする方法。

18. 敗血症または菌血症の診断方法であって、請求の範囲第1項乃至第
25 15項のいずれかに記載の方法におけるin situハイブリダイゼーション法を用いて原因微生物の候補となる微生物の遺伝子を同定する工程を含み、同定された結果に基づいて敗血症原因微生物または菌血症原因菌が特定されることを特徴とする方法。

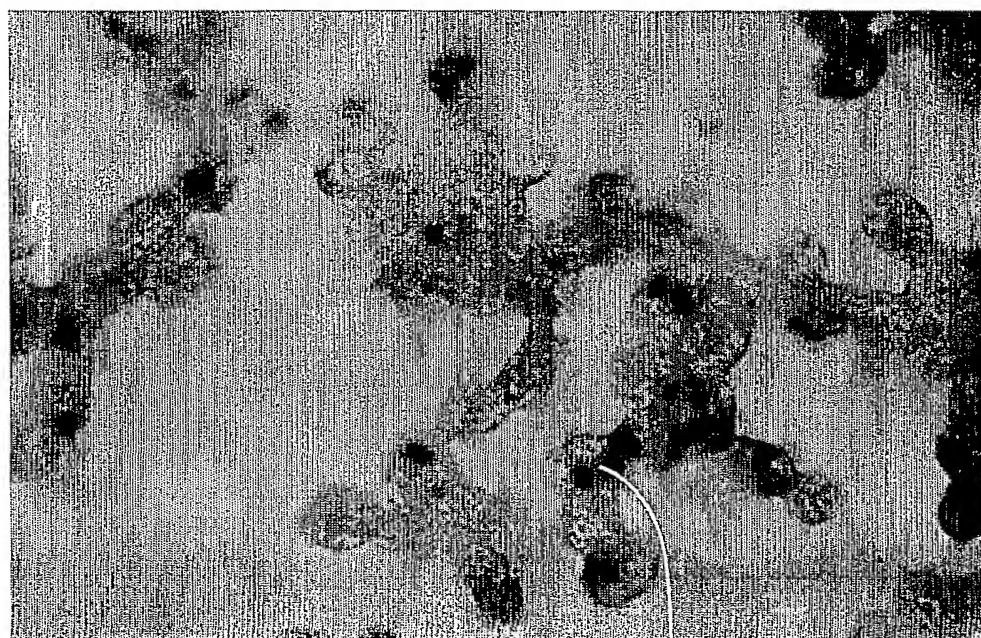
1/11

第1図



(a) SDS(-)

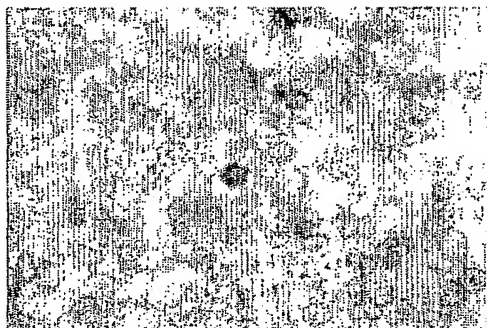
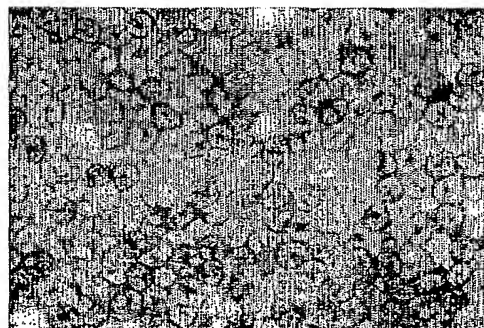
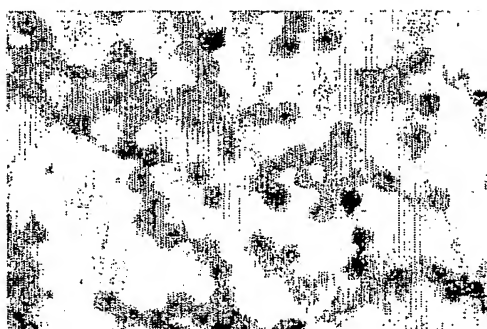
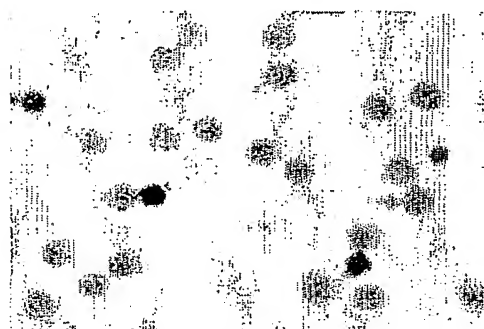
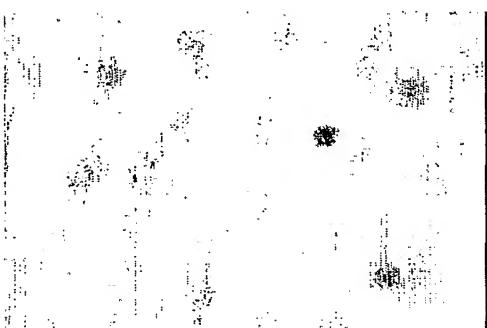
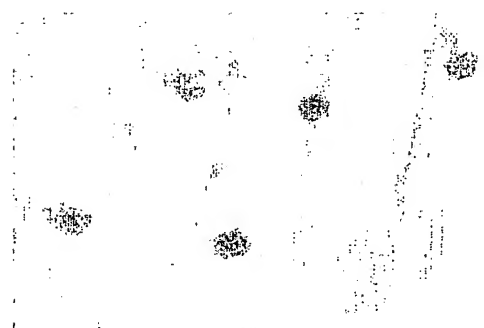
シグナル



(b) SDS(+)

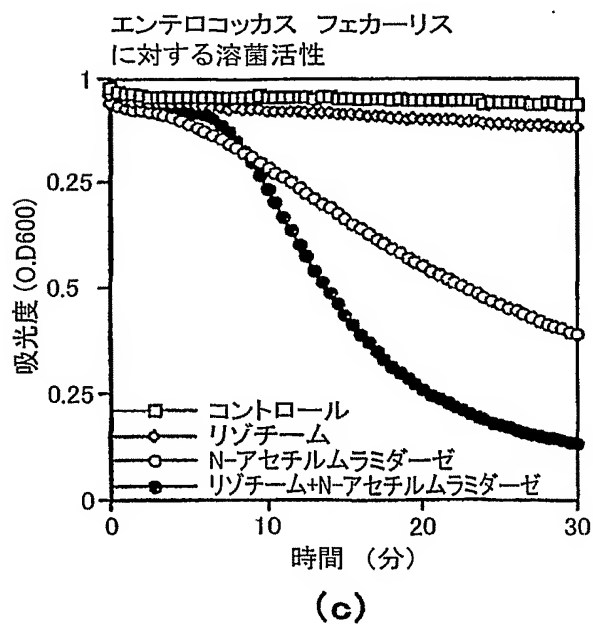
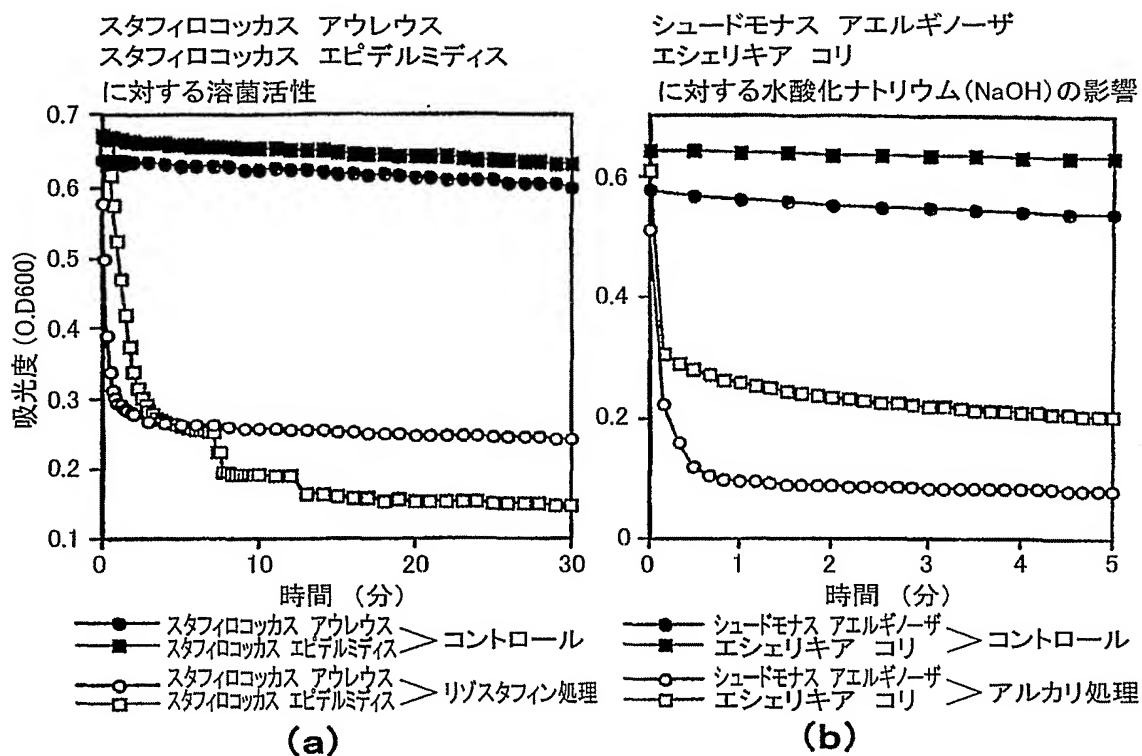
シグナル

第2図

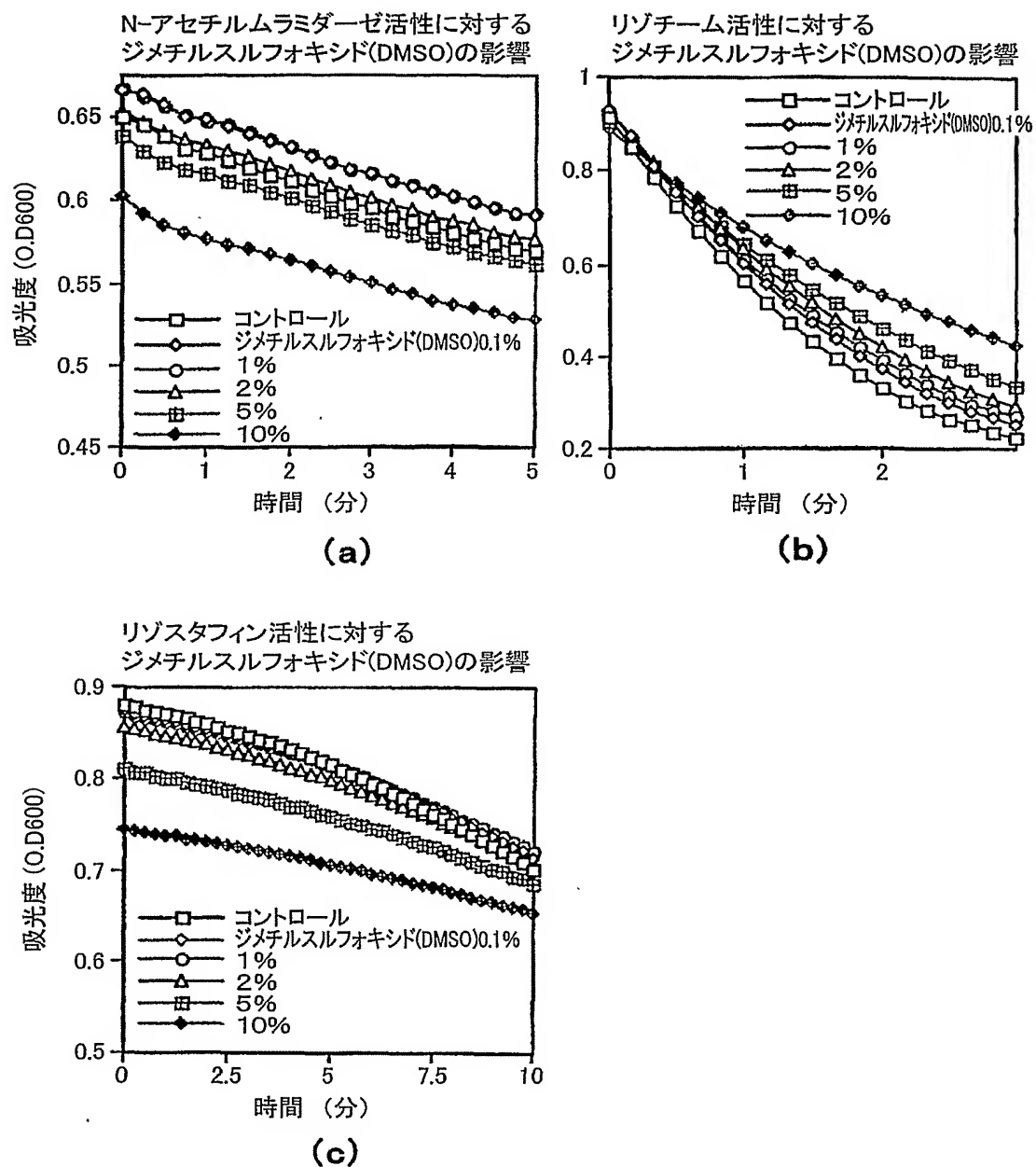
(a) 1×10^8 個/mL(b) 5×10^7 個/mL(c) 1×10^7 個/mL(d) 5×10^6 個/mL(e) 1×10^6 個/mL(f) 5×10^5 個/mL

3/11

第3図



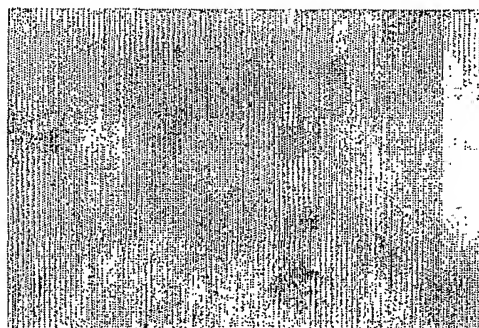
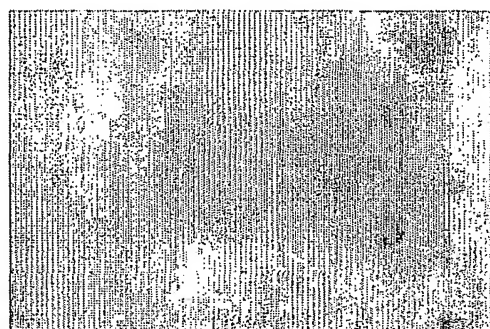
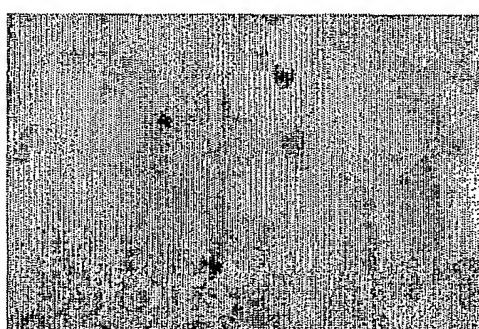
第 4 図



第5図



(a)

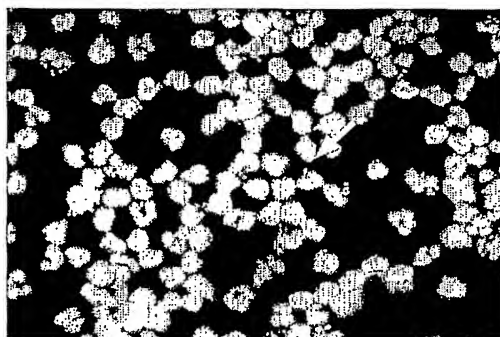
(b) PMSF 1 μ mol/mL(c) PMSF 10 μ mol/mL

(d) PMSF 0.1 mmol/mL

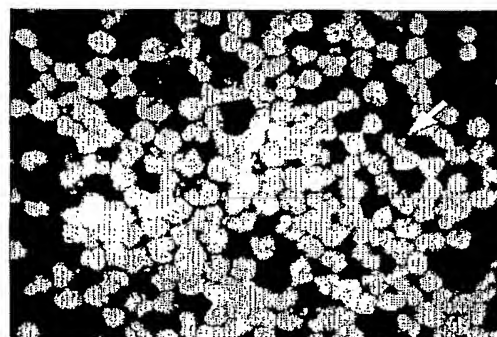


(e) PMSF 1 mmol/mL

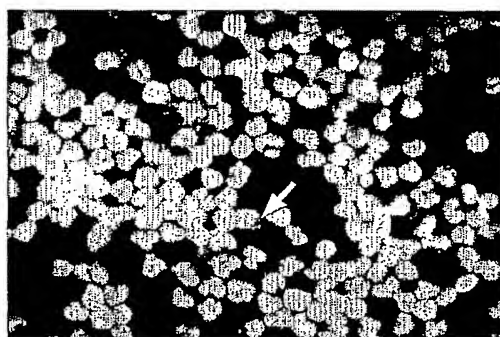
第 6 図



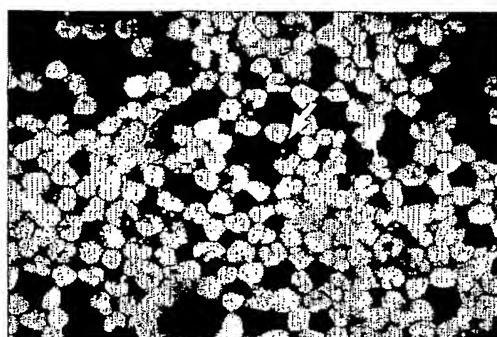
(a) SA 貪食サンプル



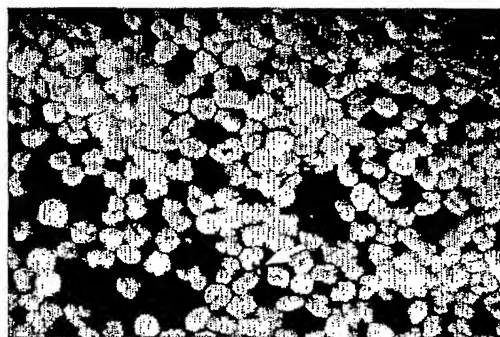
(b) SE 貪食サンプル



(c) PA 貪食サンプル



(d) EF 貪食サンプル

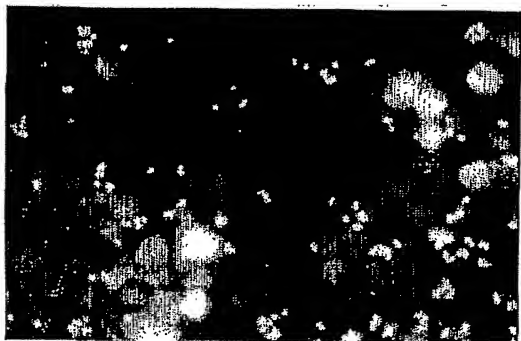


(e) EK 貪食サンプル

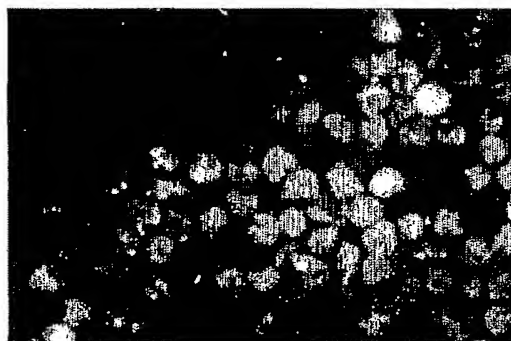
写真中の矢印は
貪食された細菌を示す

7/
11

第 7 図



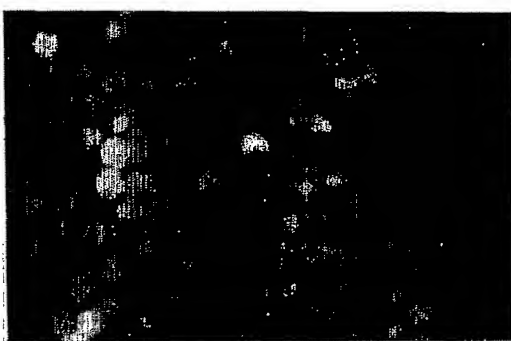
(a) SA処理前



(b) EF処理前

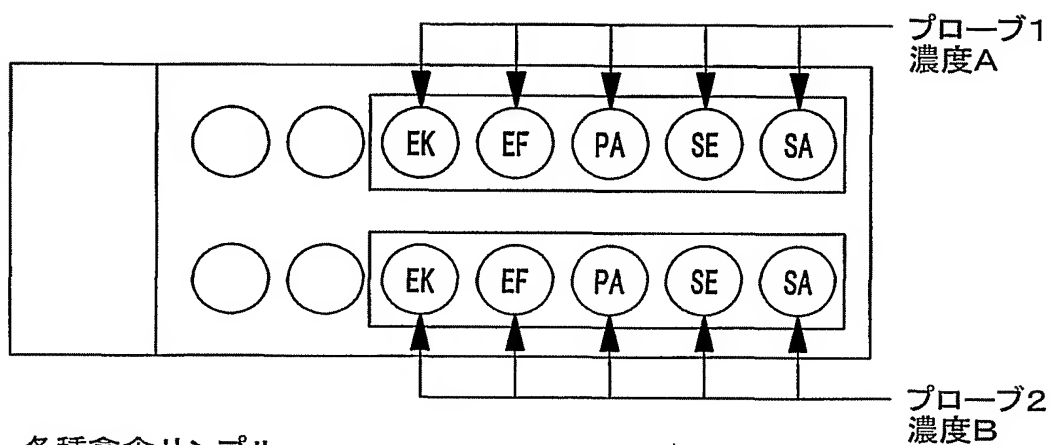


(c) SA処理後



(d) EF処理後

第 8 図



各種食食サンプル

SA : SA食食サンプル

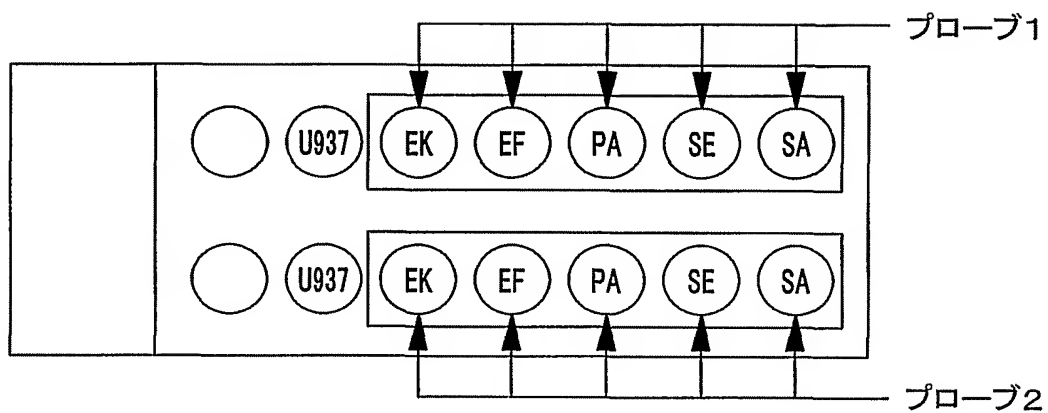
SE : SE食食サンプル

PA : PA食食サンプル

EF : EF食食サンプル

EK : EK食食サンプル

第 9 図



SA : SA 食食サンプル

SE : SE 食食サンプル

PA : PA 食食サンプル

EF : EF 食食サンプル

EK : EK 食食サンプル

第 10 図

(a) 発色後ニトロセルロース膜(上)と電気泳動図

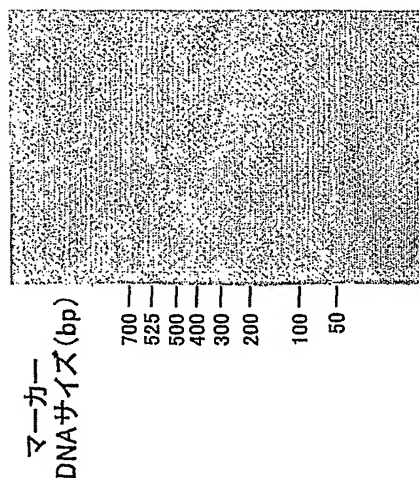
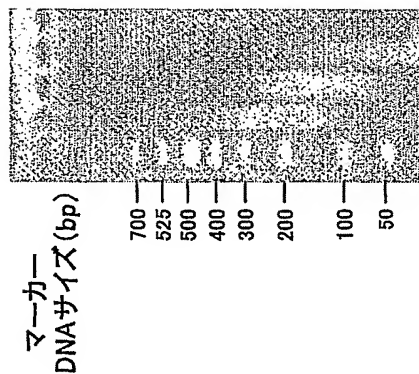
(b)

PAプロローブ
DNase 量
1.25mU
2.75mU
3.200mU

1 2 3

SAプロローブ
DNase 量
1.25mU
2.75mU
3.200mU

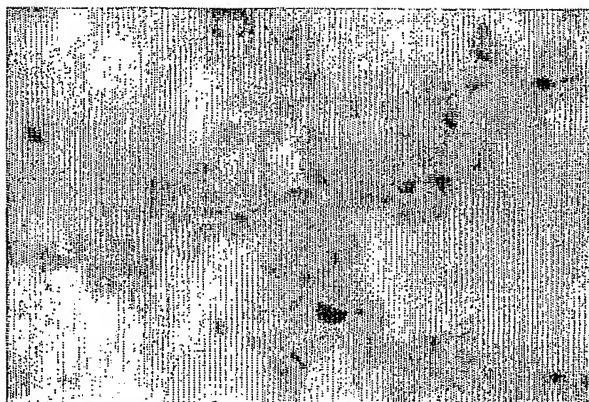
1 2 3



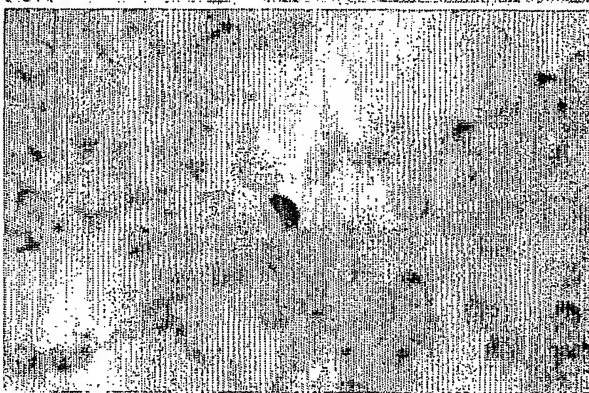
11/11

第 11 図

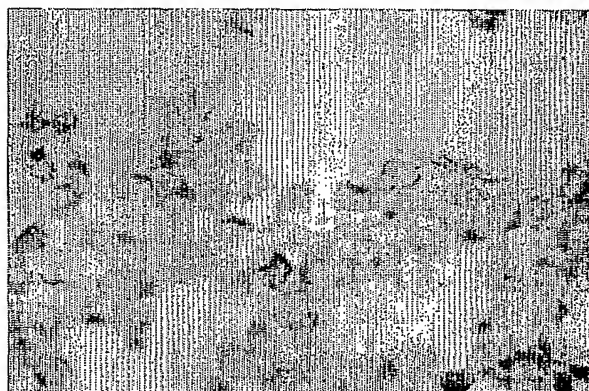
(a) EC-24



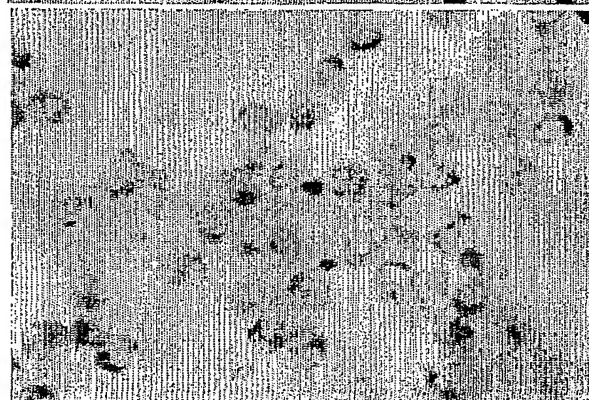
(b) EC-34



(c) EC-39



(d) Mix



S E Q U E N C E L I S T I N G

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

TSUNEYA OHNO

<120> Improved Method for Detecting and Identifying Causal
Microorganisms

<130> 02P327W0

<150> JP 2001-165929

<151> 2001-05-31

<160> 19

<210> 1

<211> 10207

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> Designated as SA-24

<400> 1

aagcttatgg acciatittt ggtatattga ttagttggct tggattaatt tctggaacat	60
ttacagtcta tttgatctgt aaacgattgg tgaacactga gaggatgcag cgaattaaac	120
aacgtactgc tgttcaacgc ttgattagtt ttattgatcg ccaaggatta atcccaattgt	180
ttatitttact ttgttttctt ttacgccaatacattaat aaattttgta gcgagictat	240
ctcatattag acctaaatat tatttcattg ttttggcatc atcaaagtta gtttcaacaa	300

ttattttagg ttatttaggt aaggaaatta ctacaatttt aacgcacccct ttaagaggga	360
tattaatgtt agttgtgttg gttgtatttt ggattgtttgg aaaaaagtta gaacagcatt	420
ttatgggatac gaaaaaggag tgacatcgtg aaaaaagttg taaaataattt gatttcattg	480
atacttgcta ttatcatgtt actgttcgta caaacittttg taatagttgg tcatgtcatt	540
ccgaataatg atatgtcacc aacccttaac aaaggacgtt gttattgtaa ataaaattaa	600
agttacattt aatcaattga ataatgggtg tatcattaca tataggcgtg gtaacgagat	660
atatactagt cgaattattg ccaaacctgg tcaatcaatg gcgtttcgtc agggacaatt	720
ataccgtgat gaccgaccgg ttgacgcac ttatgccaaag aacagaaaaa ttaaagattt	780
tagittgcgc aattttaaag aattagatgg agatattata ccgcctaaca attttgttgt	840
gctaaatgat catgataaca atcagcatga ttctagacaa ttigggtttaa ttgataaaaa	900
ggatattatt ggtaataata gtttgagata ttatcctttt tcaaaatgga cgattcagtt	960
caaactttaa aaagagggtt caaaattgaa aaaagaatta ttggaatgga ttatttcaat	1020
tgcagtcgct ttigtcatth tatttatagt aggtaaattt atgtttacac catatacaat	1080
taaaggtgaa tcaatggatc caactttgaa agatggcgag cgagtagctg taaacattat	1140
tggataataa acagggtggt tggaaaaagg taatgtagtt gtcttccatg caaacaaaaa	1200
tgatgactat gttaaacgtg tcatcggtgt tcttggtgat aaagtagaat ataaaaatga	1260
tacattatat gtcaatggta aaaaacaaga tgaaccatat ttaaactata atttaaaaca	1320
taaacaaggi gattacatta ctgggacttt ccaagttaaa gatttaccga atgcgaatcc	1380
taaatcaaat gtcatccaa aaggtaaata tttagttctt ggagataatc gtgaagtaag	1440
taaagatagc cgtgcgtttg gcctcattga tgaagaccaa attgtttggt aagtttcatt	1500
tagattctgg ccatttagtg aatttaaca taatttcaat ccigaaaata ctaaaaatta	1560
atatgaaaca aatacaacat cgtttgtcgg ttttaatact gataaacgat gttttatttt	1620
gttagtacca caataaaagc taagttcgaa atgaacttat aataaatcaa tcacaatcac	1680
tttgtgttaa aatatgtgtc aaaggaagtg agggtttgtc atgacattac atgcttattt	1740
aggtagagcg ggaacaggta agtctacgaa aatgttgacc gaaataaaac aaaaaatgaa	1800
agcagatccg ctiggagatc caatcattht aattgcgcca actcaaagta catttcaatt	1860
agaacaagcc ttgttcaatg atccggaatt aaatggtagt ttaagaacag aagtgttgca	1920
tttgaacga ttaagtcac gtattttcca agaagttggt agttatagcg aacaaaagtt	1980
atctaaagct gcaacggaaa tgatgattta taacattgtt caagaacaac aaaagtattt	2040

aaaactttat	caatcacaag	caaaatatta	tgggttttagt	gaaaaattaa	cagaacaaat	2100
tcaagatttt	aaaaaataig	cagtaacgcc	tgaacattta	gaacacttta	ttgctgataa	2160
aaataigcaa	actcgaacta	aaaataagtt	agaggataatt	gcitttaatat	accgtgagtt	2220
cgaacaacgc	attcaaaacg	agttttattac	tgggtgaggat	tcattacaat	attttattga	2280
ttgtatgccg	aaatcagagi	ggctaaaacg	tgctgatata	tatatigatg	gttttcacaa	2340
cttttcaacg	attgagttat	taataatcaa	aggatttaatt	aaataigcga	gagtgtcaca	2400
attatattga	cgacagatgg	taaccacgat	caatttagtt	ttttagaaaa	ccatcggaag	2460
tgttacgaca	tattgaagaa	atagcaaattg	aactcaatat	ttctattgaa	cgtcaatatt	2520
tcaaccaatt	atatcgcttc	aataatcaag	atttaaagca	tcttgaacaa	gaatttgatg	2580
tacttcaaat	caatcgagtg	gcatgtcaag	gtcataatcaa	tattttagaa	tctgcgacta	2640
tgagagagga	aataaatgaa	attgcgcgac	gtatcatcgt	tgatattcgt	gataagcaat	2700
tacgatataca	agatatigca	attttatatac	gtgacgagtc	ttatgcttat	ttatttgatt	2760
ccataattacc	gcitttataat	attccttata	acattgatac	aaagcgttcg	atgacacatc	2820
atccgggtcat	ggaaatgatt	cgttcattga	ttgaagttaa	tcaatctaatt	tggcaagtga	2880
atccaatgct	acgcittattg	aagactgatg	tgttaacggc	atcataatcta	aaaagtgcatt	2940
acttagttga	tttacttgaa	aattttgttac	ttgaacgtgg	tatatacggg	aaacgttggg	3000
tagatgatga	gctattttaat	gtcgaacatt	ttagcaaaaat	ggggcgtaaa	gcgcataaac	3060
tgaccgaaga	tgaacgtaac	acatttgaac	aagtcgttaa	gttaaagaaa	gatgtcattg	3120
ataaaaatttt	acattttgaa	aagcaaatgt	cacaagcgga	aactgtaaaa	gactttgcaa	3180
ctgctttttta	tgaaggtatg	gaatatattcg	aacttgccaaa	tcaattgatg	acagagcgag	3240
atgaacttga	tttaaatggg	aatcatgaaa	aggcggagga	aattgatcaa	ataatggaatg	3300
gcittaatcca	aatccttgac	gacttagttc	tagtatttgg	agatgaacca	atgtcgatgg	3360
aacgttttctt	agaagtattt	gatattgggt	tagaacaatt	agaatttgtc	atgattccac	3420
aaacattaga	tcaagttagt	attggtacga	tggatttggc	taaagtcgac	aataagcaac	3480
atgtttactt	agttggaatg	aacgacggca	ccatgccaca	accagtaact	gcatcaagtt	3540
taattactga	tgaagaaaag	aaatatatttg	aacaacaagc	aaatgtagag	ttgagtccta	3600
catcagatat	tttacagatg	gatgaagcat	ttgtttgcta	tgttgctatg	actagagcta	3660
agggagatgt	tacattttct	tacagtcctaa	tgggatcaag	tggatgatgat	aaggagatca	3720
gccccattttt	aaatcaaatt	caatcattgt	tcaaccaatt	ggaaattact	aacattcctc	3780

aataccatga	agttaaccca	ttgtcactaa	tgcaacatgc	taagcaaacc	aaaattacat	3840
tatttgaagc	attgcgtgct	tggtagatg	atgaaattgt	ggctgatagt	tggtagatg	3900
cttatcaagt	aattagagat	agcgatcatt	taaatcaagg	tttagattat	ttaaigticag	3960
cattaacgtt	tgacaatgaa	actgtaaaaat	taggtgaaac	gttgtctaaa	gatttataatg	4020
gtaaggaaat	caatgccagt	gtatctcggt	ttgaagggtta	tcaacaatgc	ccattttaaac	4080
actatgcttc	acatggctcg	aaactaaatg	aacgaacgaa	atatgaactt	caaaactttg	4140
atttaggtga	tattttccat	tccgttttaa	aatatatatac	tgaacgtatt	aatggcgatt	4200
ttaaacaatt	agacctgaaa	aaaataagac	aattaacgaa	tgaagcattg	gaagaaattt	4260
tacctaaagt	tcagtttaat	ttattaaatt	cttcagctta	ctatcgttat	ttatcaagac	4320
gcattggcgc	tattgtagaa	acaacactaa	gcgcattaaa	atatcaaggc	acgtattcaa	4380
agtttatgcc	aaaacatttt	gagacaagtt	ttagaaggaa	accaagaacc	aaatgtacga	4440
attaattgca	caaacattaa	cgacaactca	aggtattcca	attaatatta	gagggcaaatt	4500
tgaccgtatc	gatacgtata	caaagaatga	tacaagtttt	gttaatatca	ttgactataa	4560
atcctctgaa	ggtagtgcga	cacttgattt	aacgaaagta	tattatggta	tgcaaatgca	4620
aatgatgaca	tacatggata	tcgttttaca	aaataaacia	cgcttggat	taacagatat	4680
tgtgaaacca	ggtggattat	tatacttcca	tgtacatgaa	cctagaatta	aattttaaate	4740
atggctctgat	attgatgaag	ataaactaga	acaagattta	attaaaaagt	ttaagctgag	4800
tggtttagtg	aatgcagacc	aaactgttat	tgaatgcattg	galatttcgtt	tagaacctaa	4860
attcatttca	galattgtac	cagttgggtt	gaataaagat	ggctctttga	gtaaacgagg	4920
cagccaagtg	gcagatgaag	caacaattta	taaattcatt	cagcataaca	aagagaattt	4980
tatagaaaca	gcttcaaata	ttatggatgg	acatactgaa	gtgcaccatt	aaagtiacaaa	5040
caaaaattgc	catgtgcttt	ttgtagttaa	caatcggtat	gtcatgtaga	tggcatgatt	5100
gatagtaagc	gatatcgaac	tgtagatgaa	acaataaatc	caattgaagc	aattcaaaat	5160
attaacattta	atgatgaatt	tgggggtgag	taatagatga	caattccaga	gaaaccacaa	5220
ggcgtgatit	ggactgacgc	gcaatggcaa	agtattttacg	caactggaca	agatgtactt	5280
gttgcagccg	cggcagggtt	aggtaaaaca	gctgtactag	ttgagcgtat	tatccaaaag	5340
attttiacgtg	atggcattga	tgtcgatcga	cttttagtcg	taacgtttac	aaacttaagc	5400
gcacgtgaaa	tgaagcatcg	tgtagaccaa	cgtatttcaag	aggcatcgat	tgcctgatcct	5460
gcaaatgcac	acttgaaaaa	ccaacgcate	aaaattcaatc	aagcacaatt	atctacactt	5520

catagtitttt	gcttgaaatt	aattcaacag	cattatgatg	tattaaatat	tgacccgaac	5580
tttagaacia	gcagtgaagc	tgaaaatatt	ttattattag	aacaaacgat	agatgaggtc	5640
atagaacaac	attacgatai	ccttgatcct	gcttttatig	aattaacaga	acaattgtct	5700
tcagatagaa	gigatgatca	gtttcgaatg	attattaaac	aatigtatit	cittagcggt	5760
gcaaatccaa	atcctacaaa	tiggttggat	caattggiga	caccatacga	agaagaagca	5820
caacaagcgc	aacttattca	actactaaca	gacttatcta	aagtatttat	cacagctgcc	5880
tatgatgctt	taaataaggc	gtatgatttg	tttagtatga	tggatggcgt	cgataaacat	5940
ttagctgtta	tagaagatga	acgacgttta	atggggcgtg	ttttagaagg	tggttttatt	6000
gatatacctt	atttaactga	tcacgaatit	ggcgcgcgtt	tgccaatgt	aacagcgaaa	6060
attaaagaag	caaatgaaat	gatggtcgat	gccttagaag	atgctaaact	tcagtataaa	6120
aaatataaat	cattaattga	taaagtgaat	aatgattact	tttcaagaga	agctgatgat	6180
ttgaaagctg	ataigcaaca	attggcgcca	cgagttaaagt	accttgcgcg	tattgtgaaa	6240
gatgttaigt	cagaattcaa	tcgaaaaaag	cgtagcaaaa	atatcttgga	ttttctgat	6300
tatgaacaat	tigcattaca	aattttaact	aatgaggatg	gttcgccttc	agaaattgcc	6360
gaatcatacc	gtcaacacit	tcaagaaata	tiggtcgaig	agtatcaaga	tacgaaccgg	6420
gttcaagaga	aaatactatc	tigcatcaaa	acgggtgatg	aacataatgg	taattttatt	6480
atggttggag	atgittaagca	atccatttat	aaatttagac	aagctgatcc	aagttttatt	6540
attgaaaagt	atcaacgcit	tactatagat	ggagatggca	ctggacgtcg	aattgatitg	6600
tcgcaaaact	ccgttctcga	aaagaagtac	tgtcaacgac	taactatata	tcaaacatat	6660
gatggatgaa	caagtcggig	aagtaaaata	tgatgaagcg	gcacagttgt	attatgggtgc	6720
accataigat	gaatcggacc	atccagtaaa	cttaaaaagt	cttgittgaag	cggatcaaga	6780
acatagtgat	ttaactggia	gtgaacaaga	agcgcattit	atagtagaac	aagttaaaga	6840
tatcttagaa	catcaaaaag	tttatgatat	gaaaacagga	agctatagaa	gtgcgacata	6900
caaagataic	gttattctag	aacgcagctt	tggacaagct	cgcaatttac	aacaagcctt	6960
taaaaatgaa	gatattccat	tccatgtgaa	tagtcgtgaa	ggttactitg	aacaaacaga	7020
agtcgcgtta	gtattatcat	ttttaagagc	gatagataat	ccattacaag	atattttatt	7080
agttgggtta	atgcgciccg	ttatataatca	gttcaaagaa	gacgaattag	ctcaaattag	7140
aatattgagt	caaatgatga	ctacttctat	caatcgatig	taaattacat	taatgacgaa	7200
gcagcagatg	ctattttagt	tgataaatta	aaaatgtitt	tatcagatat	tcaaagttac	7260

caacaatata	gtaaagatca	tccggtgtat	cagttaattg	ataaatittta	taatgatcat	7320
tatgttattc	aatacitttag	tggacttatt	ggtggacgtg	gacgacgtgc	aaacctttat	7380
ggtttatttta	ataaagctat	cgagtttgag	aattcaagtt	ttagaggttt	atatcaattt	7440
attcgtttta	tcatgaatt	gattgaaaga	ggcaaagatt	tiggtgagga	aaatgtagtt	7500
ggtccaaacg	ataatgttgi	tagaatgatg	acaattcata	gtagtaaagg	tctagagttt	7560
ccatttgtca	tttattctgg	attgtcaaaa	gattttaata	aacgtgattt	gaaacaacca	7620
gttattttta	atcagcaatt	tggctctgga	atggattatt	tigatgtgga	taaagaaatg	7680
gcatttccat	ctttagcttc	ggttgcaiat	aaagctgttg	ccgaaaaaga	acttgtgtca	7740
gaagaaatgc	gattagtcta	tgtagcatta	acaagagcga	aagaacaact	ttatttaatt	7800
ggtagagtga	aaaatigata	aatcgttact	agaactagag	caattgtcta	tttctgggtga	7860
gcacattgct	gtcaatgaac	gattaacttc	accaaatecg	tccatctta	tttatagtat	7920
tttaictaaa	catcaatctg	cgtcaattcc	agatgattta	aaatttgaaa	aagatatagc	7980
acaagttgaa	gatagtagtc	gtccgaatgt	aaatatttca	attatatact	ttgaagatgt	8040
gtctacagaa	accatttttag	ataataatga	atatcgttcg	gttaatcaat	tagaaactat	8100
gcaaaatggt	aatgaggatg	ttaaagcaca	aattaaacac	caacttgatt	atcaatatcc	8160
ataigttaaat	gatactaaaa	agccatccaa	aacaatctgt	ttctgaattg	aaaaggcaat	8220
atgaaagaag	aaagtggcac	aagttacgaa	cgagtaagac	aatatcgtat	cggttttcaa	8280
cgtaigaacg	acctaaattt	ctaagtgaac	aaggtaaacg	aaaaagcgaa	ttgaaattgg	8340
tacgttaatg	catacagtga	tgcaacattt	accattcaaa	aaagaacgca	tatctgaagt	8400
tgagttacat	cagtatatcg	atggattaat	cgataaacat	attatcgaag	cagatgcgaa	8460
aaaagatatc	cgtatggatg	aaataatgac	attatcaata	gigagtatat	tcgattattg	8520
ctgaagcaga	gcaagtttat	cgtgaattac	cgtttgtagt	taaccaagca	ttagttgacc	8580
aattgccaca	aggagacgaa	gacgtctcaa	ttattcaagg	tatgattgac	ttaatctttg	8640
ttaaagatgg	tgtgcattat	tttgtagact	ataaaaaccga	tgcattttaat	cgtcgcctgt	8700
ggatgacaga	tgaagaaatt	ggtacacaat	taaaaaataa	atataagata	cagatgaaat	8760
attatcaaaa	tacgcttcaa	acgatactta	ataaagaagt	taaaggitat	ttatacttct	8820
tcaaatittg	tacattgcaa	ctgtagtatt	tigattttica	aaagaataaa	aaataatttc	8880
gattlaagtgc	aaagtccttg	tagcagaatg	aacacaactc	atittcaaaa	tgtcttact	8940
tatttatattg	ttatttgata	acgaaaaaag	ttataatgtg	aattaagata	aagatgagga	9000

```

gttgagaatg aatgaaattc ttatcattca agtataatga caaaacttca tatggcgtaa 9060
aagtaaaacg cgaagatgct gtatgggatt taacacaagt atttgctgac ttgacagaag 9120
gagatttcca tcctaaaaca ttgtagctg gtttacaaca aaatcactact ttagattttc 9180
aagaacaagt acgtaaagca gttgtagcag cagaagatag cggcaaagct gaagactata 9240
aaatttcatt taatgacatt gaattcctac caccagtaac acctccgaat aatgtgattg 9300
cttttggtag aaattacaaa gatcatgcga acgaattaaa tcatgaagta gaaaaattat 9360
atgtatttac aaaagcagcg tcatctttaa caggagataa tgcaacaatt ccaaatacata 9420
aagatattac tgatcaatta gattatgaag gtgaattagg tattgttatt ggtaagtctg 9480
gtgaaaagat tccaaaagca ttagctttag attatgttta cggctatata attattaacg 9540
atatcaciga tcgcaaagca caaagtgaac aagatcaagc atttttatca aaaagtttaa 9600
ctggcggttg cccaatgggt ccttatatcg ttactaaaga cgaactacca ttacctgaaa 9660
atgtaaatat tgttacaaaa gttaacaatg aaattagaca agatggtaac actggcgaaa 9720
tgattcttaa aattgatgaa ttaatagaag aaatttcaaa atatgttgca ctactaccgg 9780
gagattatta ttgcaactgg tacaccagct ggcgttgggtg caggtatgca accacctaaa 9840
tttttacaac caggigatga agttaaagtg actattgata atattggaac gctgacaact 9900
tataatcgcta aataattatc atttaaaaag ctaaccaggt ctttatatag attggttagt 9960
tttttcttgc ttttctaaaa aggtgttaaa gataaattat ttataatgtt accattttga 10020
gatgaaagtg aaatatgat attaagaagt agttgattat ttacagcag attcacaata 10080
ttctaataag ggcaatgcaa atgtcatgtt ctccctctca aatatagaag tgtggtagaa 10140
tatatatctg tgtataatca aatctagatt aaattacaag caagtgggta ttaatcccaa 10200
gaagctt 10207

```

<210> 2

<211> 2082

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> Designated as SA-36

<400> 2

aagctttctia atctatcggt aatgatttgc tttaaaattg ggtcgaagtt aattgaaggt	60
gtgaagtgtia tatctgtiatt aataaccaig tcattcattt gctgcttcac tttgttaaca	120
agtcttccgt cataataaaaa taatgggtacg acaatcaatt tttgataccg tttcgagatg	180
ctttctaaat catgtgtaaa actaatctct ccataatagcg ttctcgcata agtaggttta	240
ttaatctgca aatgttgagc gcataattgt aactcttcgt gtgccttagt aaaatttcca	300
ttaatatgtc cgtgtgcaac aaccataact ccaacttgtt gttcgtcacc tgctaattgcg	360
tcacaaatac gttgttcaat taatcgtctc attaaaggat gtgtgccaag tggctcgctt	420
acttctacct ttatgtctgg ataccgtcgt ttcatlcat gaacgatatt cgggtatatcc	480
ttgagataat gcattgcact aaagattagc aatgggtacaa ttttaaaatg gtcaacccca	540
ctttgaatca acgtcgcat taccgtctct aaatccgat gctcactttc taaaaacgca	600
atatcatagt gatgtatata atcttttact aattcagaaa taaatgcttc taacgcttga	660
ttctgtcgtc cgtgccicat gccatgtgca acaatgatat tcccattcac atttaccac	720
ccittcacac gtattgtata ccaaatcatt ttgtttttgt gaaaagaatc acattataat	780
gtaaaatcag ggaattccct gatgcctgta gtcatgcata ttccattatac attttccctt	840
tttgttfaat caaaaaaagc gaccgatata tgaatcccta ctcaacattt attttagcaa	900
gcatcaatat atcggtcgct tgtagtgtat attattatct taaaatgggtg gttggcctaa	960
tattgtttcg tcaaagcgct cgggtatcaa tactttgcgc atgatcacac ctaaatcgcc	1020
atcatcattt tcatgttcgc tgtatatttc ataacctctt ttttcataaa ttttaagtaa	1080
ccacggatgc aatcttgcag atgtacctaa agtaactgcc gctgacttta acgtatctcg	1140
caaaaatgct ctccaacata agtaagtaat tggctacat agcctttccc ttcatactca	1200
ggatttgtcg caaaccacca gacaaaagga tagcccgaaa tacttttcac acttccccaa	1260
ggatatctaa ccgtaatcgt agataataat tcatcatcaa ttgtcatgac aaatgtagta	1320
tttttatcta tattttcttt aacagcatct aaattagcat taactgaagg ccaatcaata	1380
cctagtcttc tttagaggcgt aaatgcttca tgcattgagt gtigcaattt ttctgcatct	1440
gtttcacttg cgagtcgaat catcgttttt gtcatattaa tccccactct tttttaaatg	1500
atttaacat attttatttt taaaataaat atccatcaaa gtgtatcaat aaatttatca	1560
catgtcagaa agtatgcttc atctgaatac accaatactc tcatgaaact tattaaaaat	1620

```

tactcctca acgtaaaaaa accattcaaa ttcatgaatg gtttggaaga atgattcatt 1680
gttacgctat ttaatcacta catcttaatt attgttgctc taaacgatta cgcttaccat 1740
ttaagaaagc ataaacgaga cctacaaaaa taccgccacc gacaaagtta cctaagaaag 1800
caaaaacgat atttttttaa acaigtaacc atgaaactgc atcaaggtta aagaatacca 1860
tacctgcata tagacctgca ttgaacacaa cgtgctcata tcccatgtat acaaagacca 1920
cgacaccaca agctatgaag aatgcccttg ttaagccgcc ttigaattgc atagagaatga 1980
aaataccaat attaataaag aagttacaga aaataccttt tgtaaaaata ttcaaccatg 2040
ttgaatcaac agtctttttc tgaactaaag ctgttaaagc tt 2082

```

<210> 3

<211> 2885

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> Designated as SA-77

<400> 3

```

aagcttttga ttaatttggg ctttaaagta ttcccaatta taattcttca tgattttctt 60
attggatttc gaatttgggt tcatgcattg ttgcctcaaa gaacatgctg aacagtcatc 120
gcattcataat agcttgaagt cacgtttaaa accataatcta tcattacggt atgcataatc 180
tttaaaacct attcitttgt tattaggaca tataaattca tcattaagtt cgtcatatct 240
ccaattttga gtgttaaaaa tgtcactttt aaacitttcta gttttatctt taataaacat 300
gccatacgta ataagtggcg ttttatataa acatctataa tagccatata gttttgctca 360
ctatcataac tgcatacagc acatttaactc tggtaatacc gaggatttga atcattgtta 420
aaaatggaat taaagttcta gtatctgttg gggtttgaaa taggtcatag gataaaaaaa 480
ttgagaatctt gtcgctatctt gtaaatgtga tccitggcta agttggccat ttttcataatg 540
gtcttccttc attctcataa aagttgcata atgatcagcc cagaaagcta tttctatctt 600
taagaatcca ttttgtttct tcatatctat ttttctttc ggaataatca tcaaatttct 660

```

ttttgaactt	cttaatctca	gttctttttt	acgggtctgt	tttctaattt	gagcactctt	720
cgttctaaat	agaatgattt	aaatcttcga	tttcttttat	ctaaatgact	accaattaaa	780
tctatttctt	ctcgigattt	tgaatacttt	tcttccacac	aatgtataat	ctattggcat	840
tagcttctac	ttaatgtacca	tcaataaaaa	ttgaatttatt	atcaataaga	ttttgcitta	900
aacattgact	atggaactga	ataaataaag	attcaattaa	cgcatcagta	ttaggattca	960
ctctaaaacg	attaatagtt	ttataagaag	gtgtttgata	ttgagctaac	cacatcattc	1020
gaatactgtc	atgaagtaat	ttctctattc	tacgaccaga	aaatacagat	tgagtatatg	1080
catataagat	gatttttaac	atcatttttg	gatgatagga	tgttgcgcca	cgatgatgtc	1140
tgaattcatt	gaattcgcta	tcaggtatcg	tttcaacaat	ttcattttaca	tatcgcgaaa	1200
tatcatttta	aggaattcta	acagaagttt	ctattggtag	tgtaagttgg	gcaaagtgct	1260
ttattttttt	aaagtaatga	aaagtaaaat	tacatgttaa	tacgtagtat	taatggcgag	1320
actcctgagg	gagcagtgcc	agtcgaagac	cgaggctgag	acggcaccct	aggaaagcga	1380
agcattcaat	acgaagtatt	gtataaatag	agaacagcag	taagataatt	tctaattgaa	1440
aattatctta	ctgctgtttt	tttagggatt	tatgtcccag	cctgttttat	tttcgactag	1500
tttggagaat	ttattgacat	tcacattatt	taaacggcaa	caaagattgt	tttattttga	1560
taggcattat	atgggtgtta	aaaatttgca	tgaaaattaa	aaaatgcttc	gttcaggaag	1620
gtgtcgtaat	ttacctattt	gctgaatgaa	gcatttttatt	tttaataatg	atagccaata	1680
taacaagcta	taaatccaat	gatgaattgt	aaaagtgaa	aatlgagaaa	aagggttaata	1740
tcaaattttg	gtgtcatcat	taatgtaat	tccttggcta	acgttgagaa	agttgttaag	1800
ccacctaaaa	aaaccggiga	caaagaacgc	agggaaccat	gagattgaaa	ttgataggcc	1860
tatagttaat	ccaattaaaa	aactaccaac	tagatttact	atcaatgttg	cgataggtaa	1920
ctttgaagta	aatttaigat	taaaataatc	agtaatggca	cttctagcaa	ttgcgccaaa	1980
accgccgcca	atcatgacta	aatgattga	tatcatgata	aaccaccacc	tagttttata	2040
ccgacgtaac	ataacaaaaat	accaaagaca	taactigtta	cagcatatag	tagtaaagtt	2100
ataaatgttt	gatgatcaaa	catatgtatt	aattcttaatt	gaaatgttga	aaaagtcgtt	2160
aaagcaccaa	gaaaaccagt	cgtaatagct	tttttttaggg	tcggaatggtt	tgaaaaaaat	2220
gcaattgtta	aggctgttag	caatcccat	acaaaggcac	cagtcaaat	ggctatcagt	2280
gttccgattg	gaaaacctcc	gtcagtattc	agaaaagaaa	tgaggtaacg	taataaagcg	2340
cctaaagcac	caccgataaa	aatatatata	tattgcattt	ggttcacctc	gaaaagaagt	2400


```

agtttgaatt taaaaaagag gttttggcaa cagcagaca aaaattgtcg atgcattatc 2460
aaacctcatt ataigtata tcttggtgta taactatagc gattagatgc atagttaatga 2520
tttcgaaaat ctaatatitt ttatacgcaa caacgicac aaattgtttt acicattata 2580
gcatgataca ttgtattggt ttgtattaac gctacattga cattttatct tttttaaat 2640
aaaccgaatg tacgacaatt gaaaagatat gtactaaaat aacaattaga ataatccaag 2700
gcaaactttt actcgcaatt ctaatccaat ctgcatcagg ctttagtgat ttaattgaac 2760
gatctgcaaa aattatagac aaaattagta caattgagtt aataacactg cagaaaagta 2820
ttaatttaat aaaagaattia aaaaatccac ttaggaaaac gttatttgta ttaaagaaaa 2880
agctt 2885

```

<210> 4

<211> 8654

<212> DNA

<213> Staphylococcus epidermidis

<220>

<223> Designated as SE-22

<400> 4

```

aagcttgttt tattgcttag ttatatitcc aataacacac attttataatg tacgtattgc 60
caaaaaaaaa tatctataca gtaataagta tgaaatgaga actggaataa tcattgggtat 120
tattgcttta attctagtaa ttatgcaagg gtttcacttt aactgggcta ttattcctat 180
ttctatctat ggcatcagt ttgtattttt cgctggaatt attttaagtc ttgttggtat 240
attctttaaa cgtatagaat ttgtaggagt tggcctacta ttttgtcaaa aacatagatg 300
caatggtaac tgaccggaa attgcacagt tttctcttt agcaatttgg attatacttg 360
ttgtgctaatt cattttttat acgatacgtt tatctgaacg cactaaatca tcatcatata 420
caaagattta aactcagaaa ataigttaga catatctttc tgagtttttt aatttatata 480
aatatatcat ttgtttacca tataagtttg ttttagaaaa tgaatcacta ttttaataata 540
caaataattt aattacactg aaaataacct aaaagcgtaa cactatttta atatgggtat 600

```

ataaatgact	aaagggaggt	gccaagatga	ataaaattca	aatttgtaat	cagattgaac	660
ttaactatat	tgatgaaggc	gaaggcatcc	ccatcatttt	aattcatgga	ttagatggaa	720
acttggcagg	atttaaagat	ttaaaaaatg	aactcaagaa	gcagtataga	gtaattactt	780
atgatgtcag	aggtcattga	aaatcttcac	gaacagaatc	ataatgaatta	aaagatcatg	840
ttgaagattt	aaatgatit	atgggagcat	taaatatcga	ttctgcacat	atittaggac	900
atgatatggg	gggcatcatt	gcgagtgaat	ttactgaaaa	atatcaatat	aaagtgatta	960
cattgacaat	tgtttcggcc	aaaagtgaag	acattgcaaa	tggtttcaac	aaattaatgg	1020
ttgattacca	agaagaatt	gcaggcttta	ataaatctga	ggcaatgatt	atittattct	1080
ctaaattatt	ttaaagagaaa	gataaagcaa	tgaaatgggt	atcaaagcca	aaaattatac	1140
aatagaccaa	ctccggaaga	aagtgcatt	gcagtacgtg	cattgcctaa	tattaaagat	1200
ttaactcgtg	ttcatcataa	igtgtccata	cctactttta	ttgtgaatgg	taagtatgac	1260
ccactcatac	aaaataaaaag	tcattatgat	atggatcaat	attatgatca	agttacaaaa	1320
attgtatttg	ataattcagg	acatgcacca	catactgagg	aaccagaaaa	attcctgaaa	1380
ctctacttag	atittgttag	ttaaaaaata	agaacataaa	taaaaaccct	taaatgatta	1440
ttgtcggaaa	atcatttgag	ggttttgtag	tagcagttaa	gtttggactc	agatcactat	1500
cgtattaact	taataaaaga	gtaaaacagt	cttatctttc	ataagtgaag	gaaatatctg	1560
tttnactccc	tagccattat	acttcatttc	attatttgct	tcttgigatac	ggttgtttac	1620
tcgtttaagt	aaatcatcga	tttttttacg	ctgcttagaa	tctactaaga	ttaaaacagt	1680
tcittcatcg	tgttcattac	gttttttatt	aaagtaattt	tcttgagata	aatttttaac	1740
agctttaaca	acttgagggt	gtttataatt	taagtgaattg	ataatacttt	taagataata	1800
ttcctcttct	ttaattctac	taatataagt	taatactgca	aattcttcaa	agctgattga	1860
gaattctttt	ttaattattc	cttttaattc	gtcagcataa	gtgaccatag	ctaataattc	1920
aaagcagtca	ttgatTTTTG	aaatagccat	taatgaaacc	tccttattta	tatcatatcc	1980
ataaatctta	aaacccatct	ttttaaatTT	aaagatagtt	aatttatatta	ttgaattaag	2040
attacttgga	tactataccc	taatttatTT	atttatactt	atttttctta	tgaaaaatcg	2100
aaagtgtccg	tcataataata	gtattaattt	aaatttaaag	aatatattta	atgctatatt	2160
atttagttta	ttataactaa	ataaaattaa	gaagttaaaca	aataagtgtt	tataaaacaa	2220
attatctttt	aaagtttata	cttgaattag	caatgtagca	tttgctatat	tcaaaaaaat	2280
aagattgttt	ctaattttcc	ttaattttaat	aaaaattata	ctaaaaagaa	tactttttgg	2340

aaagaatitit	actaacattt	tttatatata	aatgtititit	aattitagaag	taggatititit	2400
aacaactitit	tcactatca	ataagccitit	agtatatatta	ataatcccac	ttttiaaact	2460
ctttitgtat	gttacttctc	ttttitgtaga	attaaaacat	agcgtitititg	aacaatagct	2520
gacgttaggtta	actctatgtc	atttgaggct	aattitgattt	ttaaagtgtgt	tccaattitga	2580
tgatitgggtt	gtgtagaaag	taaaatgtcgt	taatatgaga	cgccatititit	tattititgat	2640
ggtatatitcg	aaattitctit	aattitacta	gtaaattgag	tgtitgtcact	agatgtitaca	2700
gaaatatitit	gattitattit	taataaatct	aactcagatt	cigatatatt	agcacgaata	2760
atacgtitcgt	tgtctattaat	tgtcactatc	ttttcgtititg	gtttitgaagg	gatagaatta	2820
atatatgaaa	tactitccatt	aattgggtgaa	aataaagtgg	atttaattga	ggattitagt	2880
tgaatcattt	gtaatititag	cigattaagg	aatgaataat	aatgtaaatc	attititagaa	2940
tttaaagtit	tgtitgtitacg	ttcattacta	agtgtatitit	ggagtctctc	atataaatga	3000
tctttitcat	aattitgaata	tcttaacact	ggagtgtitit	tagatactit	gctatgattt	3060
tttactaaaa	gtttitggag	tgttctctaaa	gtgggagtgt	agtagaaaat	atagctitit	3120
agaggggctt	gtataccagt	tgttgaaagg	agtaattitgg	gctitgtctt	tatagtitit	3180
atattititaa	tatctitctgt	tttagaagt	aattitagaga	aagtaatgt	actaaaacta	3240
caagtigtga	gaatgaaaat	gaatagtat	gaagaaaata	cgaatgcgtitg	cttgggtcatg	3300
gatgtitcacc	tcaataatatt	attitgtagg	tattatcac	tattatitit	aatgaaatat	3360
attatititit	aataagcatt	actititgg	tgtatatitgt	titattitcaa	aaaataaagt	3420
aatcaattit	aataaattga	aaaatagaag	gctatctitit	attitaaaaat	ataatgattct	3480
acataaatgt	tactataaga	agaatcactc	ataaaaactg	ccaacaaaga	caaaatctit	3540
gtitggcagt	cgaaatagac	attitattitgt	atgaggaatc	tacattata	taagcggata	3600
attititattc	agaataagga	attitaaaaata	atcgtataata	aataatacct	atagctatac	3660
ataataatcc	acctaaactta	cgtgatgtit	ttitgtitit	aggitgaacct	aacaaaccga	3720
aatgatcgat	aataatacct	ataatcattt	ggcccatcat	agcaattata	gtagttaaag	3780
ctgtctctaa	gaaaggcatt	aaaataatat	tagatgttac	gaatgccatt	cctagtatcc	3840
ctccaataaa	ataaatagat	ttaatcttac	ctagtgtit	atgagtagat	gatattitca	3900
gactacgatt	aaataactaat	gttaatatata	ataacgtat	tgtaccaacg	ctaaatgata	3960
tgagtgaagc	aaatatggat	gagitgtitgt	gttgagccag	tgtgtgtitg	attititgtit	4020
ggattggcgg	acgaaaccaa	atacgaatcc	aataagcaac	cagaatacta	tgtgtgtatt	4080

cttatgtctta ttaacaggat gcttacgaac ataattcata aatataattc cagtaattaa	4140
aaatataatt ccaacacctt taaataatgt aaaagattgt tgaatgggcgc ccaataatcc	4200
aaatgtatca atgattacac ccataataat ttgccctgia accgtaataa caacagtaag	4260
tgctgcgcct aatcttggta ataataataa gtitccagtt aaatagataa cacctaatag	4320
tcctcctagg acccaagtat agttaagtgt ttgcttagaa aagaatictg gtgttaatac	4380
ttgtggatga ataatgatat taagcacaag taagcatatt gticcgacag caaaagatat	4440
ggttgaagca taaaaagatg aacgggtaaa ttggcttagc cttagattga ttgaagtttg	4500
aataggaagt aacatgccaa caaaaattcc taaaagatat agaaaaaca atgataaaaa	4560
ccaactttct caatttaata tgattatcat accattcata atcatgtttc taaaatgatt	4620
gagccataag caaagtatag aaataagttg tgaatgttcc gaggtgtcat acagccgata	4680
ctattttgat gaatcattat aataaaatgc acattaaaca agtttttagaa ttaaaaaaag	4740
cgagacatca ttttgaattt gatattctac ttcataattaa taaaagaaca atgtaaatta	4800
agttcttttt tagacttgaa caattttaaa aaatttgttc ttcgataagt cttttttatg	4860
attttagtac tttaaataaa gcgtcaaaaa taatgtttta tgaattaatt tttatcttca	4920
aatataacag ttgtccittt atcaataagt tgtgcagcat aaattttgac aggttttccc	4980
aaactaaatc ttaaaatgtc taattctaaa atgtctaatt ctaaaagttg gttcatactt	5040
tctttaatta attgttctgt agtaatagcg ttaaaatcgg gtaatagtaa tttgacgggt	5100
ttattaagat ttgatttaaa taccgagttc aaagtttttg acatactgat gtatcttctt	5160
taaattaaag attctgtttt aacgatctcg actttgtcat actcttcgcc actgaacgtt	5220
caatgatgga acgaaaagat ttgatattgat cattagaaac aagcggatta atgttagaaa	5280
aacgacgctt atgttcgact actttacctt cagaattatg tttgatattga gttaaagataa	5340
tcgtcacttg attgacttca ttcataataa aaccttcttt cactatatai atcgaaatag	5400
attgaaaaaa aaggacacat tttttgaaaa atataggcaa atgcctttga tgtgatacaa	5460
acgtcattta tcatthaatta tgaaacctgt tttagaaggt atatgaggta agtagaattg	5520
ttaagttgia aaagaaaaaa ttggaacctg atatttaaaa taaccaactt aaaagattga	5580
tcagtgtcta aaattactat ttatatatga attaaaatat taagatctcc caatatgaga	5640
atgaattagt ttaagtttat cgatgattga aaaattatag cctcatggat tctatcttat	5700
ataaaataaa gtictattcc cttttggata taaataagaa tagttacctt tttgtgatat	5760
gccaatlcag aaaaaaagcg acagtgcctg aatctatgta tgctcaataa actcattcaa	5820

atcaactagc aatatcaaat cataaatcgt gtigcaccat aataaggatt aaaacctgtt 5880
agtttaacta atttaagaaa aacatttgat tatcttctct ttcaatcggg aatattaatt 5940
tctatcattc aacaatattt tggatatcag ataacttaag aaatattgag atttattgaa 6000
atacgataig tttcaaatcg ccatacaatg attacactta ataaatgatt acacttaata 6060
taaagttaaa aagaaaagga ggggttaaat gagtttagta tatcttatgg cgactaattt 6120
attagtcatg ctcatagttt tattcactct gagtcacgt caactaagaa aggttgcggg 6180
ctatgttgca ttaatagctc ctattgtgac atctacatat ttattatga aaataccaga 6240
tgtgattcga aataagitta ttgctgttcg attaccatgg atgccttcaa ttgatattaa 6300
tttagattta agattagatg gtttaagttt aatgttcggc ttaattattt cgctaatagg 6360
tgtgggtgta ttttttatg ctacgcaata tttatccac agtacggaca atcttcctag 6420
atttttcattc tatttactat tatttatgtt cagtatgatt ggcatgttaa tagctaataa 6480
taccatctta atgtatgtat tttgggaact cacaagtatt tcctcattct tgcattatac 6540
ctattgggtac aataatggtg aaagtcaatt aggcgccatt caatctttca tgattacagt 6600
gtttgggtggg ctagcggtat taacaggatt tatcatttta tatacatta caggaacaaa 6660
cacaattact gatacttaa tcaacgcaat gcaatttcac gacatccttt atttatacca 6720
atgattttga tgctattatt aggtgccttt accaaatctg cacaatttcc gtttcataatt 6780
tggttaccaa aggccatggc agcacctaca ccagtaagtg ctatcttca ttcggcaaca 6840
atggtaaagg ctggaatctt ttactattt agatttacac ctttattggg acttagtaat 6900
gtttataatt atacagtac atttgtttgt ctaataacta tgttatttgg atctttaact 6960
gccttacgac aatacgactt aaaaggtata ctgccttatt ctacaataag tcaattaggt 7020
atgattatga caatggtagg tctagggtggc ggttaigctc agcacacatc agatgaattg 7080
tctaagtttt atattttagt tttatttgct ggcttattcc atttaatgaa tcatgcggtt 7140
tttaaatgtg cattatttat gggcgtttgt atcattgac acgagtcggg aacacgtgat 7200
attcgtttgc taaatggtat gcgtaaagtc tcccciaaaa tgcatattgt catgttgctc 7260
gctgcattat ctatggcagg tgttcctttt ttaaatggct ttttaagtaa ggaaatgttt 7320
ttagattcgt taactaaagc aaacgaactt gatcaatatg gcttcgtatt aacgtttgtg 7380
attattticaa taggtgtcat cgcgagtata ttgactttta cttatgcact ttacatgata 7440
aaagaaacat tctggggaaa ttacaatat gaaaaattta aacgtaaaca aatacatgaa 7500
ccatggctat ttagtttacc agctgtgatt ttaatgttac icaattccagt tatcttcttt 7560

```

gttccaaacg tttttggcaa ctttggttatt ttgcccgcga ccagaictgt atctgggata 7620
gggcggaggt tgaatgcatt gtgccacata tttctcagtg gcatgggtgt aatctccatt 7680
aattttaaga tagtgtatat attggactat tttagctcta gtgtgattgg aaagaggtta 7740
cgcatcaaat aatcaaaaagt gctcgattac agtggctatc ggaaatttat agagaatttg 7800
aattatactc agcccgtagt atacgtgcat tgaigaataa taaattgaat tattacatca 7860
tgattacatt atttattttt gtagctattg tagttatgga tatttgactg tgggttttcc 7920
tcatgtactc agcttcatat tagttcttcc ggaccgttgg aagtatctt atcagttgta 7980
acattgatta tcggcatttc attaatcttt attcgtcaac gactaacgat ggtgggtattg 8040
aatggaatga ttggattcgc agttacatta tattttattg caatgaaagc tccagattta 8100
gcittaacac agttagttgt tgaaactatt acgacaatct tatttattgt tagtttttcg 8160
agactaccta acatccctcg agttaaggca aatttaaaaa aagagacctt caaaatcatt 8220
gtgtcacttg ttatggcatt gacgggtgga tcacttattt ttgttgctca acaagcagat 8280
ggatagccct caattgctaa attttatgaa gatgcataig aacttacagg tggaaaaaat 8340
attgtcaatg ctatactagg tgacttcaga gctttagata ctatgtttga aggactagtg 8400
ttaatcatag ctggattagg tatttatacg ttacttaatt acaaagatag gagggggcaa 8460
gatgaaagag aatgatgtag tacttaaatc agttacaaaa attgtagtgt ttattttgtt 8520
aacatttgga ttttatgtat tttttgctgg ccataataat ccaggtagtg gctttatttg 8580
tggcttgatt tttagctcgg catttatctt aatgtttctt gcctttgatg taaatgaagt 8640
gttgaaaaaa gctt 8654

```

<210> 5

<211> 2362

<212> DNA

<213> Staphylococcus epidermidis

<220>

<223> Designated as SE-3

<400> 5

aagcttcaca	acttgaaaat	atagcacaaa	cattaaagga	tttaggtaga	aaacgagcaa	60
ttttaattca	tggtgcaaat	gggatggatg	aggccacgct	ttctggtgaa	aatatcattt	120
atgaagtiag	cagcgaaaaga	gcattaaaaa	aatatagitt	aaaagcagaa	gaagtcggtt	180
tagcttaigc	aaataatgac	acgttgatag	gtggttcacc	tcaaacaaat	aaacaaattg	240
cattgaatat	cctaagtggc	acggatcact	caagtaaacg	agatgtagtt	ttgttaaattg	300
ctggaattgc	tttatatgtt	gctgagcaag	tggaaggtat	caaacatggc	gtagagagag	360
cgaataatct	cattgataca	ggtaiggcaa	tgaacaata	tttaaaaatg	ggagggttaag	420
taatgactat	tttaaatgaa	attattgagt	ataaaaaaac	tttgcttgag	cgtaaatact	480
atgataaaaa	acttgaaatt	ttacaagata	acggaaatgt	taagaggaga	aagctgattg	540
attcacttta	actatgatag	aacattatca	gttattgctg	aaataaaatc	gaaaagccca	600
tctgtacctc	aattaccgca	acgtgatctt	gttcaacaag	ttaaagatta	tcaaaaatat	660
ggtgctaattg	ctatttcaat	attaactgat	gaaaaatact	tiggcggtag	tttgaacga	720
ttaaatcagt	tatcaaagat	aacatcgtaa	ccagttttat	gtaaagattt	tattattgat	780
aaaattcaaa	tagatgttgc	aaaacgagct	ggatgatcta	ttattttatt	aatagtaaatt	840
attttaagtg	atgaccaatt	aaaagaattg	tattcataatg	caacaaacca	taatttagaa	900
gctctagtag	aagttcatac	aattagagaa	cttgaacgtg	cacaccaaatt	taaccctaaa	960
attattgggtg	tttaataatcg	tgatttaaaa	cgatttgaaa	ccgatgttct	acatacaaat	1020
aaattactta	agtttaaaaa	gtctaattgc	tgctacattt	cagagagtgg	cattcataca	1080
aaagaagatg	ttgagaaaaat	agtagattca	agtattgacg	gttacttgt	aggggaggca	1140
ttaatgaaaa	caaatgactt	aagtcagttt	tttgccctagt	ttaaagttaa	agaagaatct	1200
ctatgatagt	taaattttgt	ggtttttaaaa	ccgaaagtga	tatttaagaaa	attaaaaaat	1260
tagaagttga	tgcagtaggg	tttatacatt	atcccgatag	taagagacat	gtctcactga	1320
aacaattaaa	atatttggct	aaaatagtgc	cagatcataat	agagaaagta	gtgtcgtagt	1380
aaatcctcaa	atgtccacca	taaagagaat	aattaatcaa	actgatatta	acacaatcca	1440
attacatgga	aatgaaagca	ttcaattaat	tagaaataatt	aagaaactta	attcaaaaaat	1500
aagaatcata	aaagcaattc	cagcaacaag	aaattttaaat	aataacattc	aaaagtataa	1560
agatgagata	gactatgttt	attatagata	caccatcaat	cacatacggg	gggacaggtc	1620
aaagttttga	ctggaaatta	ttaaaaaaaa	taaaggcggt	gattttctca	ttgcggtggt	1680
ttggattttg	aaaagataaa	acgattagaa	atataattcat	ttggacaatg	tggttatgac	1740

```

atctcaactg gcattgagtc acataatgaa aaagatttta ataagatgac tcgaatatta 1800
aaatttttga aaggagacga atgattaatg aaaattcaaa cagaagtaga tgaattgggc 1860
tttttcggtg aatatggtgg ccaatatgta cctgaaacat tgatgccagc tattattgaa 1920
cttaaaaaag cataatgagga cgcgaaatca gatactcact tcaagaaaga atttaattat 1980
tatttaagtg aatatgttgg tagagaaacg cttttaacat ttgctgaatc atacacaaaa 2040
ttgttaggtg gtgccaaaat atatcttaaa agagaagact taaatcacac tgggtgctcat 2100
aaaattaata acgcgatagg acaggcacta ttagctaaaa ggatggggaa aactaaatta 2160
gtagccgaaa caggtagctgg tcaacatggt gtagcaagtg ccaccatcgc tgctttattc 2220
gatatggatc ttattgtttt catgggaagt gaagataatca aacgtcaaca acttaacgta 2280
tttagaatgg aattgctagg agctaaagta gtgtctgtgt cagatgggca aggaacacta 2340
tcagatgctg taaataaagc tt 2362

```

<210> 6

<211> 5024

<212> DNA

<213> Staphylococcus epidermidis

<220>

<223> Designated as SE-32

<400> 6

```

aagctttttg atttttaag aaaaaattaa acaagggggc attgcttatg gtcaatagaa 60
gaaagataatc aattattggc gcgggacata caggigggac tctagcattc attcttgcac 120
aaaaggaatt aggagataat gtgttgattg aacgccagca atcagagggt atggctaaag 180
gaaaggcggt agatatttta gaaagcggac ccatitgggg gtttgacaca tctgtacatg 240
gttcagtaaa tatagaagat attaaagatt cagacatagt ggtgatgact gcaggatatac 300
ctaggaaatc aggaatgaca aggagaagaa ttagttcaaa ctaatgaaca aatagtiacga 360
gaaactgcat tacaaattgc aacgtatgca cctcattcaa taattattgt attgactaat 420
ccggttgatg ttatgacata tactgcattt aaagcatcag gttttcctaa agaacgtatt 480

```


attgggtcaat ctggaat ttt agacgctgca agatatcgaa cttttattgc tcaagaactt	540
aacgtgtctg tcaaagatgt aaatgggttt gttttagggtg gacatgggtga tacgatgtta	600
cctttgattt ataacacaca cattaatggg attccagtta agcatcitat ttctgaagaa	660
aagattgatc aaattgttga acgtacacgt aagggtgggtg cagaaattgt tgcattacta	720
gggtcaaggct cagcatattt tgcaccagca actgctatat atgaaactat agatgcaatt	780
tttaattgatc ggaaacgggt attaccaagt attgcttata tagaggggaga atacgggtgt	840
tcagatat ttt gtctcgaggt tcctactata ataggataac aagggaataga aaagattata	900
gaggtagata tgaataatga tgagtatcaa caactacaac actctgcgca agatgtgagt	960
gaagtcacaaa actcactaaa attcaaatata ataattatga agttctacat cttaaattgt	1020
tagat tttttg tgaattgt gttaaagggtt ttttttcgtt gatttataaa agcgccttct	1080
tgatataatg aacatatatt catagaataa ggagacgatt aaaatggcta aagggggacca	1140
atatcaagct cacttgaaa aatatcatga gtaaaaagtc taaaaaagt tataaacctg	1200
tgtggattat cattagtttt attattttta ttacaatctt gttattacc acaccagcag	1260
gattacctgt aatggctaaa gcagcactag ctatttttagc ttctgctgta gttatgtggg	1320
ttacagaagc agttacttat ccagtttctg caacattaat tttaggatta atgatacttt	1380
tactaggttt aagtcaggt caagatttat ccgaaaaact tggaaacctt aaagtggcga	1440
cataatacta aaaggtagcg atatttttagg aacgaataac gcgcttagtc acgcttttag	1500
tggtttttca acctcagccg tagcacttgt agctgcagca ttatttttag cagtagctat	1560
gcaggaaacc aatttacata aacgacttgc attatttgtg ctatcaattg ttggaaataa	1620
aactagaaat atagtcattg gtgctatttt agtatctatt gttctagcat tctttgtacc	1680
atcagctaca gcacgtgctg gtgcagttgt cccaatatta ctgggaatga ttgctgcatt	1740
taatgtgagt aaggatagta gacttgcttc attattaatt attactgctg tacaagcagt	1800
ttcgatatgg aatataggta ttaaaaacgg ctgcagcaca aaatattgta gccatcaatt	1860
ttattaacca aaatttagga catgatgtat catggggaga gtggttttta tatctgcgcc	1920
gtgggtcaatc attatgtcta tagctcttta ttttataatg attaagtta tgccacctga	1980
acatgatgca attgaagggt gaaaagagtt aattaaaaag gaacttaata aattaggacc	2040
agtcagtcac agagaatggc gactaattgt gatctcagtg cttttatatt ctctggctga	2100
ctgagaaaagt attgcatccg attgattcag ctctgattac actagtgtgt ctaggtatta	2160
tgctaattgcc aaagattggt gttattactt ggaaagggtg tgaagaag attccttggg	2220

ggacgattat agtatitggt gtaggaatct cacttggtaa tgtattactt aaaacaggag 2280
ccgctcatgg ttagtgatca acatttgttt gatgggtctt aaacatttac cgatcatagc 2340
aactattgcg ttaattacct tatttaatat attaatatcat ttaggttttg caagtgaac 2400
gagcittagcc tctgcgttaa taccitgtgtt tatttctttg acttcaacgc taaatttagg 2460
tgatcatgct attggttttg tattaatata acaattitgtg attagttttg gtttcttact 2520
accitgtcagt gcaccacaaa ataigcttgc ataiggtact gggactttta ccgttaaagga 2580
ttttttaaag acaggtatac cttaacgat agtaggttat attitagtta tcgtatttag 2640
tttaacgtat tggaaatggc ttggtttagt gtaagtaaaa gatttaggta ttaaaatgat 2700
aattataaaat gtctcgtaaa gtttaatat ttaacittac gacacatttt ttataaactc 2760
gtggcaagtt aatcttaata gttgaaatgt atcgtataaa aaatatatga atgtaaatag 2820
aatttagtat tagagaataa caaaaaattg atgittaggig gtaaaatcta atggctatag 2880
gtgtcatatt aaatagagtt tttaggctaa ataataatcc attatttgat tatatatata 2940
gtaataaaga atctataaat catgtttatt ttattattcc aactgaagag ttigaagaag 3000
aagcaaaaaa gaaagcacia tactattatg ggtccataca gaagtttatg tatgaactac 3060
aacgataatga tatagaacce tttttgatgt cttatgataa attaatagac ttttgtaaaa 3120
aacaagctat agacaaagtt gttgttgcag gtgatattat gagttatcat cacgaagaat 3180
atgacatttt acatcaaagg aaacgattta aacaagctaa tattcaagta atatcattaa 3240
gagcaaatca ttattttaac ccccgcaaaa cacataataa acaaggggaa ccataataaag 3300
tatttaccag tttttataga aaatggcgtc cttacttaat gattagagat gaatatgact 3360
atcattttaga agatatttca aaggttgtag tgaaatctca acataaaatt aaagaagatt 3420
atcattcata tggatataagt gaacgtgatg ttcaaaatcg ttggcttgaa tttttatctc 3480
aagatatcga aaattataaa gaaaacaggg aatacttgcc tgaagtatta acaagccaac 3540
taagtattia cttagcttat ggaatgatag atattatata atgttttcaa cgatttactt 3600
caaaattatg ataaaaatga acaaaattac gaaactttta tacgtgaatt gattttttaga 3660
gagttttatt atgtattaat gaccaattat cccgaaacag ctcatgttgc ttttaaagaa 3720
aaataccaac aattgaaatg gtctttataat gaagagaatt ttaaaactgtg gaaagatggg 3780
aatactgggt ttccaattat tgatgcagca atggaggaac ttaaaacaac tggatttatg 3840
cataatcgca tgagaatggt agtttctcaa tttttaacta aagatttgtt tattgactgg 3900
atttgggggtg agtcattttt caaacaaaaa ttaaatagatt atgatgcagc ttcaaatggt 3960

```

cacggatggc agtgggtcagc ttctactgga acagatgctg taccatactt tagaatgttt 4020
aatcctataa gacaaagcga gcgttttgat aataatgcac gatataataa aacttacatt 4080
ccaagattaa atcaggtaga tgctaagiat ttacacgata ctcataaaatt cgagcaacaa 4140
ataaaggggc aagggtgtga aataggtaaa gactatccta aacaaatgat tgatcacaaa 4200
gaaagtagac aacgtgtaat gtcagaattc aaagctatag attaaataaa aaagatctga 4260
acaacatgat atagggtgtc agatctttat ctagttacat aaaaaagcaa acatgaatta 4320
aaatataatt taacaaagtt aaaataiaca tataatttaag atttaattta gttttcaaag 4380
gtacttccca atttgtataa cggggctcat aataaaataa ttgcatcaaa tataatccta 4440
tccttaacgg taaacacatt aataaaatag ctttagtata aciccatcct atttgatgcc 4500
ataaatgacc tatcataagi tgaataatga tgagacatac cattaaaatt acttcaatta 4560
tcattgggat aatctcacc ctttaataaa caatatgact gttagcttga tgagcaccat 4620
taaaacgaca aatagtaacg ctttaacatc tatgattaaa aaaacctctt tcacaatttt 4680
taaagggtga ttttaataaat agacagtatg taatcttaag aatcgaccga tgtaaatacc 4740
taatccattt aagaacatta atataactat caatagtcga ttttaaccata cataagacgt 4800
aaaatgtgca atttctaaaa atataagaat tgtgaggtat attgctaaga gtacgccaag 4860
tattaaatag gigaataaaa tccattctgt gatgtttaat ccagctaaaa agttaaattg 4920
aaattggttt aagtgtatga gatcggtaat catataaaat gtgttttgaa ctaataatag 4980
aaatatgagt ccgaaaacaa taaataaggg ccattcaaaa gctt 5024

```

<210> 7

<211> 9515

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<220>

<223> Designated as P2-2

<400> 7

```

aagctttcct ccagaccctt caccgccgtg gagatcgacg gctgggcgat gtacagcttg 60

```

cgcgaggcct	cggccacgct	gccgcattcc	acggtgggtca	cgaaatactt	gagttgccgc	120
aaggtatagg	acgccactgc	aagacctcat	cggcgcatca	tcctccccgg	gccgggctg	180
cgcgccctga	ttgttgtgtc	cgccgcgctg	caagcaagtt	gcaggccgct	gccgagcgtc	240
gcgcgctggc	cgcggaacga	ttgcccgcct	gcacgataac	ccagcacgac	gcactttgcc	300
ggggcacgcc	tggccagctt	tttcttatgt	cccaggagaca	tttttaataa	ttttccttcg	360
ccgcggcttg	cgcgaccatc	cttccccatc	gaccccatgg	acagcggttc	gcctccccggc	420
ggtccggggc	atgcgtgcag	aaccacgacc	ggcgcagacc	ggcgagataa	caaggagaag	480
gtgggggtgt	cgaactcagc	gattggcaac	ggcgcgccgc	gacacagcgc	ttcatcgacc	540
aggccctgat	cggcgggccg	cagcgtccag	ccgccagcgg	cgctaccttc	gacgccatcg	600
atccggcgag	caatcgccig	ctggcgcggg	tcgcggccctg	cgatgcggcc	gacgtcgacg	660
cggcagtggc	cgccgccccg	cgcgccttcg	acgaaggccc	ctgggcgcgt	ctcgccccgg	720
tcgagcgcaa	gcgcgtgctc	tgcgcctggc	cgagctgatg	ctggcccatc	gcgaagagct	780
ggcgttgctc	gactcgctga	acatgggcaa	gccggtgatg	gacgcctgga	acatcgatgt	840
acccggcgcc	gcccacgtct	tcgcctggta	tgcggaaagc	ctcgacaagc	tctacgacca	900
ggtcgcgccg	gccgcccagc	agaccttggc	caccattacc	cgcgtgccgc	tgggggigat	960
cggcgcggtg	gtgccgigga	acttcccgtc	cgacatggcc	gccitggaagc	tcgccccggc	1020
cctggccgcc	ggcaactcgg	tgggtgctcaa	gccggccgag	cagtcgccgt	tctccgccct	1080
gcgcctggcc	gagctggccc	tggaggcggg	ggtgccggaa	ggcgtgctga	acgtggtgcc	1140
gggcctcggc	gagcaggccg	gcaaggccct	cggcttgcac	ccggaggtgg	acgcactggt	1200
gttcaccggc	tccaccgagg	tcggcaagta	cttcatgcag	tattccgcgc	aatccaacct	1260
caagcaggtc	tggctggagt	gcggcggtia	gagtcggaac	ctgggtgttcg	ccgattgccg	1320
cgatcttgac	ctggcggcgg	aaaaaggcgc	cttcggcatt	ttcttcaatc	agggcgaggt	1380
ctgttcggcg	aactcgcgct	tgctgggtgga	gcgttcgatac	cacgacgagt	tcgtcgagcg	1440
cctgctggcc	aaggccccgc	actggcagcc	gggcgatccg	ctggacccgg	gccagccgcg	1500
ccggcgccat	cgtcgaccgc	cggcagaccg	ccgggattct	cgccgccatc	gagcgggccc	1560
aaggcgaggg	cgcgaccctg	ctcgcggtgg	ccgccagtig	acgatcaacg	gttcggacaa	1620
cttcatcgaa	ccgacctgt	tcggcgacgt	acgcccggac	atgcagctgg	cccgcgagga	1680
aatcttcggc	ccggtgctgg	cgatcagcgc	cttcgactcc	gaggacgagg	ccatagccct	1740
ggccaaggac	agccgctacg	gcctcgccgc	ctcgctgtgg	agcgacgacc	tgcaccgtgc	1800

gcaccgggtg	gcgcggcgct	tgaatgccgg	aacgtgtcgg	tgaataccgt	ggacgcgctg	1860
gacgtcgcgg	tgcctttcgg	cggcggcaag	cagtcgggct	tcggtcgcga	cctgtcgtcg	1920
cattccttcg	acaagtacac	ccagttgaag	acgacctggt	tccagttgcg	ctgaagacgc	1980
gacggacgcg	acacgactcg	atgccgataa	cgacaacaag	aggacgatcg	aatgaacgac	2040
acgccgaacg	tgcgtgagcc	ggccctgcgc	cgcgtgctcg	ggctgggacc	gctgcctggc	2100
gtggccatcg	gccctggtgt	ttcccagggc	gtgatggta	tgatgctgca	aggcgccggg	2160
acggccggcc	tgggcttcac	cgtgccgctg	ggagtggcct	acctgctggc	gctgactacg	2220
ccttttcctt	ttccgagctg	gccctgatga	ttccccgcgc	cggtagcctg	agcagctaca	2280
ccgagggtggc	catcgggcat	ttcccggcga	ttctggcgac	cttttcgggc	tacgtgggtg	2340
tggcgaigt	cgccctctcg	gcggaactgc	tgtgtctcga	cctgatcatc	ggcaaggctc	2400
accccggcgc	gctgccgccg	atgctggtgc	tacggcgctg	tcggcctgtt	cacctgctc	2460
aacctgctcg	gcatcgacat	cttcgcgcgc	ctgcagagcg	cgttggcgct	gctgatgatg	2520
atcgtcctgc	tgggtgctcg	cctgggtgcg	gtgagcagcg	accacgcttc	cgcgcagacc	2580
gccctggcga	gcggctggaa	cccgttgggg	gtaagcgccc	tggcgctcac	cgcgatggcc	2640
gtgtggggct	tcgtcggcgc	cgagttcgtc	tgcctgcctg	tggaggagac	gcggcgctcc	2700
gagcgcaaca	ttccgcgttc	gatgatcctc	ggcctgagca	tcattcttct	gaccatcgcc	2760
ctctactgct	tcggtgcgct	gctgtgcata	ccgcaggcgg	aactggccgg	cgacctcgct	2820
ccacacttcc	cttcgcca	ccgcgtgttc	ggcgagiacg	gccagctgtt	cctgggtgatc	2880
gccgcgatca	ccgccacctg	cagcaccttc	aactcgtcgc	tggcggcgat	cccgcggatg	2940
ctctacggga	tggcgcagaa	cggccaggcc	ttcccgaat	tcaagcagct	cagccggcgg	3000
gcgcgcacgc	cctgggtggc	ggtgtgtgtc	gtcgcgcga	tcaccggcct	gccgatccctg	3060
atcctcggcc	aggaccggga	ctcgatcaac	ctgctgctgc	tcgccgcgc	gctggcctgg	3120
ctgctggcct	acatcatcgc	ccacgtcgac	gtgctggccc	tgcgccgtcg	ctatccgcac	3180
atcgcctgtc	cgtttcgcac	gccgttctac	ccgttgcgc	aactgttcgg	catcgcgggg	3240
atgatctacg	cgggtgtcca	cgtctcgccg	accccgaaa	tgaccggacg	gatcttcgcc	3300
agcgccggcg	tgggtgctcg	cgtgtgtctg	ctgggtggcg	tgggtgtgat	caagggcgctg	3360
atgcgcaagc	ccctcttcgt	acccgaaccg	ctcgagacgg	ccggtgagac	tgccaggggc	3420
aagtcgctcg	ccctcgatcc	cctgcaatcc	cttcggcctg	acgcgccaag	ggaacaagga	3480
gaacacagac	gatgaccgct	cagctcaacc	cgcagcgcg	caccgcgcac	taccagcaac	3540

tggacgccgc	gcaccacatc	cacgccttcc	tcgaccagaa	ggcgtgaac	cgcgaaaggc	3600
ccgcgggtga	tgggccgcgg	cgaaggccctg	cagctctggg	acaacgacgg	caagcgctac	3660
ctggacggca	tgccggccct	ctggctgacc	aacctcggt	acggccgcca	ggacctcgcc	3720
gccgccgcca	gccgccagct	ggaacaactg	ccgtactaca	acatgttctt	ccacaccacc	3780
cacccggcgg	tggctggagct	ttccgagatg	ctcttcagcc	tgctgccgga	ccactacagc	3840
cacgcgatct	acaccaactc	cggctccgag	gccaacgagg	tgctgatccg	taccgtgcgg	3900
cgctactggc	agatcctcgg	caagccgcag	aagaagatca	tgatcggccg	ctggaacggc	3960
taccacggct	cgaccctggg	cagcaccgcg	ctcggcggga	tgaagtcat	gcacgagatg	4020
ggcgcatgct	gccggacttc	gcccacatcg	acgaacccta	ctggctacgc	aacggcggcg	4080
agctgagccc	ggccgaagtt	cggctcgccg	gcggcgctgc	aactggagga	gaagatcttc	4140
gaactgggcg	cggagaacgt	cgccgccttc	gtcgccgagc	cttccaggg	cgccggtggc	4200
atgatcttcc	cgccgcaaag	ctattggccg	gagatccagc	gcctctgccg	gcagtacgac	4260
gtgctgctgt	gcgccgacga	agtgatcggc	ggcttcggcc	gcaccggcga	atggttcgcc	4320
cacgaacact	ttcgcttcca	gccggacacc	ttgtccatcg	ccaagggcct	gacgtccggc	4380
tacatcccca	tgggcgccct	ggtactcggc	aagcgcatcg	ccgaggtgct	ggtggagcag	4440
ggcgggggtgt	tcgcccacgg	cctgacctat	tccggccacc	cggctggcggc	ggcgggtggc	4500
atcgccaacc	tcaaggctgc	gcgacgaggg	cgtggctcacg	cgggtcaggg	aggagaccgg	4560
cccctacctg	caacgctgcc	tgcgcgaggt	cttcggcgac	catccgctgg	tcggcgaggt	4620
ccagggcgcc	ggcttcgtcg	ccgcgctgca	gttcgccgag	gacaaggtga	cccgcaagcg	4680
cttcgccaac	gagaacgata	tggcctggcg	ctccgcacc	atcggcggct	tcgaggaggg	4740
cgtgatcata	cgtccaccc	tcggccgcat	gatcatggcc	ccggcgctgg	tggccgggcg	4800
tgccgagata	gacgaactga	tcgacaagac	ccgtatcgcg	gtggatcgca	ccgcgcgcga	4860
gatcggcgctg	ctctgacgcg	ccccggcggc	ccggcctcgg	ccgggtcgcc	tgcgacacgg	4920
agcgtccccc	cataacgacg	atcgggcgcc	tggcgaccgc	gcgcggaacc	gtttcggcct	4980
ctggcggcaa	ctgcctaagc	aacatcacia	caatgccaat	cggctgtggg	agtgttccat	5040
gttcaagtcc	ttgcaccagt	acgcacacgt	gtttcccgg	ttgtccctgt	tcgtccctggc	5100
gttcgccgcg	gcggcccagg	cgcagagcca	gagctgacg	gtgatctcct	tcggcggcgc	5160
gaccaaggcc	gcccaggaac	aggcctatct	caaacccttc	gagcgaagcg	gcggcgggca	5220
ggtggctgcc	ggcgaataca	acggcgaaat	ggccaagggtg	aaggccatgg	tcgacgtcgg	5280

caaggctcagc	tgggacgtgg	tcgaggtgga	gagccccgaa	ctgctccgcg	gctgcgacga	5340
ggggctgttc	gaacgcctcg	acccggcgcg	tttcggcgac	cccgcgcagt	tcgtccccgg	5400
cactttcagc	gagtcggggg	tgccaccta	cgctcggtcg	atggatgatg	cctacgactc	5460
gacgaagctg	gccaggggcg	cgcagtcctg	ggcggatttc	tggaacgtcc	gcgagttccc	5520
ccggcaagcg	tgccctgcgc	aaggggcgca	agtacaccct	ggaagtggcg	ttgctggccg	5580
acgggggtgaa	ggcggaggac	ctctacaagg	tactcgccac	cccggagggg	gtcagccgcg	5640
cctttcgcca	agctcgacca	gctcaagccg	aacatccagt	ggtgggaggc	cggcgcccag	5700
ccgccgcaat	ggctggcggc	cggcgacgtg	gtgatgagcg	cggcctacaa	cgggcgcctc	5760
gccgctgcgc	agaaggaggg	ggtgaaactg	gccatcgctc	ggcccggcag	tccttacgat	5820
ccggagtact	gggcgggtgt	gaagggcacc	ccgaacaagg	cgcctggcga	gaaattcctc	5880
gccttcgcca	gccagccgca	gacgcagaag	gtgttctccg	agcagatccc	ctacggggcg	5940
gtacacaagg	gcacctggc	gttgctgcgc	aagacggctg	aggaggcgct	gccgaccgcg	6000
gccggccaac	ctcgaaggcg	cgcgggcggt	ggatgccgag	ttctgggtgg	accacggcga	6060
ggagctggaa	cagcgtttca	atgcctgggc	gcgcgctgag	cgcctgcgct	cggcaaaaaa	6120
aatgacgggc	cccaagtcgt	ccggggcccg	cgggtcaaag	cgcctgacgg	gtgatcagcg	6180
cagctcttcc	aacaaccctt	gcagataccg	acagccctcg	gtatccagcg	cctgcaccgg	6240
aaggcgcggc	gccccacctt	ccaggccgga	gaggcccagg	ccggccttga	tgggtggtcgg	6300
caggccccgg	cggaggatga	agtcgagcag	cggcaactgc	cggtagaaca	gcgcgcgggc	6360
cttctccagg	tcgccgtcga	gcaccgcctg	gtagagctgg	ccgttgagcg	tcgggatcag	6420
gttcggcgcg	gcgctgcacc	agcctttcgc	gccggccacg	aaggcctcca	gcgccagcg	6480
gttcgagccg	ttgtagaagg	gcaccgggcc	ttcgccgagc	aggcgagctt	tgtgcatgcg	6540
ctggatgtcg	ccggtgctct	ccttgaccat	ggtcacgttg	tccacttcgc	ggacgatgcg	6600
caggatcagt	tccaccgaca	tgtcgatgcc	gctggtgccc	gggttggtgt	agagcatcac	6660
cggcacgccg	atggcttcgc	caaccgcgcg	gtagtgcagg	aacacttccg	cctcggttag	6720
cttccagtag	gagatcggca	ggaccatcac	cgcctcggcg	ccgagggatt	cggcgaactg	6780
cgcgcggcg	acggtcttgg	cgggtggtcag	gtcggagacg	ctgacgatgg	tcggcacgcg	6840
atgggcgacg	gtcttcaggg	tgaagtcgac	cacctcgtcc	cattccgggt	cgttcaggta	6900
ggcgcccttc	ccggtgctgc	cgagcggggc	gatggcgctg	acgccgccgt	cgatcaggcg	6960
ctcgatggag	cggccgaggg	cgggcaggtc	gagaccgccg	tcggcgccga	aggggggtga	7020

tggtgtagcc	gatgatgccg	tggttggaig	cggacattgg	atgtacccgt	gacattgagt	7080
gggaaatgcc	aggacggacc	tggtgggaaa	ggtcgttcag	ctcaggcagt	cgctgttcgc	7140
cggcaggcag	cgccgggcgt	agtagttgaa	tgcggcgccg	tggcgcttcg	gggtggagat	7200
ccagtcgtgg	gcctcgcgcg	ccagggcccg	cgggatacggc	tigatctctc	cggcggccat	7260
cgccagcaac	tgcattcttcg	ccgcgcgctc	gagcagcacc	gcgatacgcg	aggcctcttc	7320
gatgctcgca	ccggtggcca	gcaggccgtg	gtgggagagc	aggatggcgc	gcttgctgcc	7380
gagggcggcg	gagatgatct	cgccttcttc	gttgcctacc	ggcacgcccg	gccagtcctt	7440
gaggaaggcg	cagtcgtcgt	atagcgggca	aaggctccatg	tgcgagacct	gcagcggtac	7500
ttccagggtc	gacagcgccg	cgatgtgcag	cgggtgggtg	tggatgatgc	agttgacgtc	7560
cgggcggggcg	cgatagaccc	agctgtggaa	gcgattggcc	ggattcgcca	tgccgtgccc	7620
gtggaggacg	ttgaggctct	cgtcgaccag	cagcaggttg	ccggcgctga	tctcgtcgaa	7680
gcccaggccc	agttgctggg	tgtagtaggt	ccccgcctcc	gggccgcgcg	aggatgatctg	7740
cccggcgagc	ccggagtcgt	ggccggcctc	gaagagaatc	cggcagggtca	gggccagctt	7800
ttgccggtca	gtccacgtat	tatcgccgag	gctgcttttc	atctgcttca	gcgcgtgctg	7860
gatcagttga	tccttgggta	attccagtgt	cgtaaccaatg	cgaggttcct	ttgacggagc	7920
gagtcggggg	aaacgccagg	cagttgcgcg	ccacgcaacg	acccggctgt	aaatgacacg	7980
gatcaagtta	tatgacacaa	agtgtcattt	agcaagagag	aagtttcatc	gccatcggga	8040
gaaggctgtc	ctcaatgtcc	atgcgcttga	aattgctgag	aaaaaaaaactc	ggggtcacgc	8100
tggagaccct	ggccgacaag	accggcctga	ccaagagcta	cctgtccaag	gtcgagcgcg	8160
ggctgaacac	gccgtccatt	gccgccgcgc	tgaagctggc	gaaggcggtg	aacgtgcagg	8220
tggaggagct	gttctccgag	gaaagcgacg	gtgtcgacgg	ctacagcatc	gttcgtcgcg	8280
accagcgcaa	gtcgtctgcc	agcggcgacg	acggcccggc	ctacgcctcc	ctcgtcgacg	8340
cagatcggcg	cccgcgcgct	gttgccgttc	atcgtccacc	ccccgcgcga	tttcagtcac	8400
tcgacgttca	aggagcacct	cggcgaagag	ttcatcttcg	tccatgaggg	ccaggtcgag	8460
gtcgacttca	tgaaccagcg	gatcattctc	gagcgcggcg	acgccctgca	tttcaacgca	8520
cagaagccgc	accgcatccg	ctccctgggg	gagacccagg	cggaaatgct	ggttggtgatc	8580
cacagcgacg	aatgaggcga	cggcttcggt	cgatcggaig	cttgctaacg	ttctgttcga	8640
ttatcgaact	gttaatcgat	tatcggaattg	tgagccctcg	gaccccgcg	taaggttctc	8700
gtcacgtgcc	gtccaggcag	cgcacaacaa	gacgagaccc	gaccgatggc	tgaatctctc	8760


```

tccctgcgcg aacggtgcga cgcttcgtcc acgatggcga cagcgtcgcc ctccaaggct 8820
tcactcacct gatcccgacg nccgccggcc acgagctgat ccgccagggc aggaaagacc 8880
tgacgctgat ccgcatgact cccgacctgg tctacgacct gctgatcggt gcaggctgcg 8940
cgaagaagct ggigtcttcc tggggcggca accccgggtgt cggttcgctg caccgcctgc 9000
gcgacgcggt ggagaagggc tcggccgcaa ccgctggaga tcgaggaaca cagccacgcc 9060
gacctcgcca acgcctatit tgccggcgcc tccgggctgc ctttcgcggt ntgcgcgcct 9120
acgccggctc cgacctgccg aaggtcaacc cgctgatccg cagcgtcacc tgcccgttca 9180
ccggcgaagt gctggcggcg gtgcccctcg tgcgtccgga cgtcagcgtg atccacgcgc 9240
agaaggccga ccgcaagggc aacgtgctgc tctggggcat cctcggcggt cagaaggaag 9300
cggccctggc ggcgaagcgc tgcattgtca ccgtcgagga gatcgtcgac gaactggacg 9360
ccccgatgaa cgcttgcgtc ctgccgagct ggggcgccta gcgccgtgtg cctgggtgcc 9420
ggcggcgcg atccgtccta tgcccacggc tactacgagc gcgacaaccg ctcttaccag 9480
gactgggacc cgatcgcccg cgaccgcgaa agctt 9515

```

<210> 8

<211> 2291

<212> DNA

<213> Enterococcus faecalis

<220>

<223> Designated as EF-1

<400> 8

```

aagctttaga taatgataaa cgcgtgtatg tgaatgtcca gccgattcaa tcgcctactg 60
gagaaacagt gattgggtgc ctttatgtga aaagtaattt agaaaataaa taccaagaaa 120
ttactaacac agcaagtatc tttttcactg ctctatttat tgccgcagca atctcgatta 180
ttgtgacctt actgattgca cgatcaatca cgaagccgat tggtgaaatg cgcgagcaag 240
ccattcgaat cgctcgtggg gattacgctg gaaaagtaga agtccatgga aaagatgaat 300
taggccaatt agcagaaaca tttaatcaat tatcagaacg gattgaagaa gcacaagaaa 360

```

caatggaagc	agaagaatcg	tttagatagt	gtcttaacgc	atatgacaga	tggtgtcatt	420
gcgacggatc	gccgcggaaa	ggtgattacg	attaatgaga	tggccctttc	attattaaat	480
gtaaaaaatg	aaaatgtgat	tgggacctcg	ttattagagt	tgttagatai	tgaagaagat	540
tacacattgc	ggaagctgtt	agaagagcca	gatgaactgc	tgattgatcg	ctcaacgtct	600
gatcgtgaag	aagaccaaat	gattatccgg	gtagacttta	cgatgattcg	tcgggaatca	660
ggatttatta	ctggcttagt	ttgcgtacct	catgacgtca	cagaacagga	aaaaaacgaa	720
cgggaaagac	gggaatttgt	ttccaatgtt	tctcatgagt	tgcgacgcct	ttgacaagta	780
tgcgtagtta	tatagaggct	ttgagtgaag	gagcttggga	aaaccctgag	attgcgccga	840
atttcttaaa	agtcacgtta	gaagaaaccg	accggatgat	tcgtatgatt	aatgatttgt	900
taaatttata	tcggatggac	tctgggaata	cacatcttca	attagagtai	gtgaatttta	960
acgaattgat	taattttgtc	ttggatcgct	ttgatatgat	gattgaaaat	gagcaaaaaa	1020
attacaaaat	tcgccgtgaa	tttactaaac	gcgatttaig	ggtagagtta	gatacagaca	1080
aagtaattca	ggtttttgac	aacattttga	acaatgcgat	taagiattcg	ccagatggcg	1140
gcgtcattac	ctgccgacta	gttgaaacac	ataataatgt	cgctcttagt	atctcggacc	1200
aaggtttggg	catccctaaa	aaagatctcg	ggaaagictt	cgagcgtttt	tatcgtgtgg	1260
ataaagcacg	tgcgcgagca	caagggtggga	ctggtttagg	tttagcaatt	tctaaagaag	1320
taattcgggc	ccataacggg	agtatttggg	tggaaagtac	agaaggtgaa	ggatcaactt	1380
tctatatttc	actaccatai	gaaccttaig	aagaggattg	gtgggaatga	tgaaaaaatc	1440
agaatggatt	acaagaattg	gcttgatitt	gatggtcatt	ttaagtatai	atttttcagt	1500
caatatctgg	ctgaattctg	ccaaaaaatg	accagaaatg	aagtcgggaa	gccaaagtcac	1560
aacagctgtc	aatgaaaaag	ccattggcga	tgtctattta	cttttgcaat	tgattcgaat	1620
agccgatgga	aaagcgatgc	aaagtaatcg	tgaacattta	attagtaatg	ttcaaaatga	1680
tattaaaaatg	gctacgtttg	gtaaattgac	acaagttgtg	acaaaaaatg	cagagcaact	1740
taagcgttac	aaccaaattg	aacaaggcat	tgaacttctt	tatcaaggtc	cttttttaat	1800
ctcggactat	gcttcgattt	ataatctatc	cattaatitt	actaacttta	atgagttgac	1860
ggaccagiat	tttacgaaaa	ttcaattgga	ttttaacgaa	aataagatac	gtttttttaga	1920
ttatgatcaa	tccaacgtct	atgaagcgcc	catgactgtt	aataaggcgc	gcttaatggg	1980
aattatcaat	aaagagggat	tgcaatatca	agacgtttcc	gaaaatacgc	taaccaacaa	2040
aggacaatgt	tatttaacca	atgatatgaa	gttgaaaaag	tacagttata	tcttanttcg	2100

caaccagtta ctcgttttag gaatgctttt ttcaatgaaa cggaagatat ccaaaccaat 2160
gaagacagtc aagacttaac ctatcagagt aaagaagaac gattgtttgc agaagaaaaa 2220
ctggggaaaa tcgattttta agggaccttg ccagaagaga ataaacggga ctcaatctat 2280
aatcaaagct t 2291

<210> 9

<211> 2441

<212> DNA

<213> Enterococcus faecalis

<220>

<223> Designated as EF-27

<400> 9

aagcttctgc gctaggaacc agccctttta ttacatctcc ccaacttgga ttigacaatg 60
ccacttgata agcaaaaatc acaaaaataa caacaattta agcaacaaca atagcttcaa 120
tttttctaaa accaattttt gtcaataaca acaaaagtaa aacatcaa at accgtaatga 180
agacagccag acctaaagga atatgaaata ataaatataa ggcaattgcg ccccgataa 240
cttcagcgat atctgtagcc ataattgcta actctgttaa aatccataat acaataccta 300
acgtcttact agttctagca cgaatcgctt gtgctaaatc catctgtgaa caatgcctaa 360
tttagcagcc atatatigga gcaacattgc aatcaaactg gaaattaaaa taatcgacat 420
caataaatat tgaaaatttt gtccccagct aattgaagta gaccagtttc ctggatccat 480
ataccccact gctaccaatg ctcttgacc tgagtaagca aataacgttt tccaaaaact 540
catattttta ggcacgtcga tggtgccatt aatttcttca agcgaaggac catttgcata 600
ttcaatcaaa tgaigtcttt gctttggttc atgttcttct gaatttttca attcaattcc 660
ttctttcggt ttgcaataat tttaaaaggc ccttcccggt agaaggttaa cctctagiat 720
attttaggta cacctaaaat atactgctaa aaataacaaa atgcaagact tgaaagaaaa 780
ttttgacagt gtaaaaatag attgtcgtaa atgtgcgata ttaaagtttg aagaaatcag 840
ggtagctggg agttgattat cttaagaagt agaaaataag ggacctaatg catttcggct 900

```

taggtccctt attttatitt tattcggtta ttctattaag aatggatgct acaatttcgt 960
tcgtgtcagc tgaatgatit ctaaaatctc gtaaacctaa tctgacgaaa accttcaagt 1020
acttcgggca acttatittt cccccattca aaagttccat catttcittt caataatctt 1080
tgtaaaatit ctcttttctc gaccgctaac aaaaaatgat aaacgtcaat gcctgtctgt 1140
ctcagatata caatcagctc ttcttcata tcatTTTTat aaagggtcat tgtaacaata 1200
atcggccgtc cagacitctt ggacattcgt tttaataaat gagcattcca gcaacgccat 1260
tcctgatact cctgaaaatc attttctttc atttcttcgg gaactagctc catcaatgca 1320
ctaccaataa tttctggatc ataaatgatt gcgttgggaa gttttgttg taactcatgt 1380
gcaatggctg tttttccgga tccaaacgca ccgtttaacc aaataattat cataatttcc 1440
ttttcttctg aacaaatttc ttgttggtt aatttaggtg ctagattact tttaatTTTT 1500
ttagccattc acttatagtt actacttaca tctttaacag taaacgagac aaactaaaaa 1560
tacaacatcc tacgctatta acctcgggtt atataacata ctcactgat aatttctccc 1620
taaaaaaaca gaatgtgggc aatcttttta agaataattg aatagaataa caacaaacag 1680
taattcaggt ataaccagct agaaattgtt ttatTTTTtag tcacgagtat gataagcatg 1740
taaatcaaat agaatcata ttaggtgaggt tactctgaag aacacagggt atcgctcgga 1800
aatgtcgaga gacagtaacg agtaaagcag ggattgtcga attaaggctt tcctaagata 1860
actagaatTT tttctttacg tctcagaaag ccaaagctca attattgtga ttacctata 1920
atcttcttct tttattcggc gacctcttta atatgattaa ttggagggtt ttaaaattgaa 1980
agctgtcact gcatcatcta agaaaaatac cctacttgct aaaagtatcg ggaatcttac 2040
cttgctcatc attttaggca ttttcatttt tatcatcgtc ttctcttggc taaaaatgaa 2100
tcgccctctc cacacccttc cctcagaaga attcctcgca acaccaagta aacagatga 2160
tttcttatct ccatcaaate ttttttactt ttcaattcga accatgtttc gaatgattgt 2220
ggggatggct tggctcttcc tgttttcctt tgtttttggg attttagccg taaaatataa 2280
aacggcacga agagtcattt taccattagt taatttccit gaatctgtc catlgctagg 2340
ttttttgacc tttaacaact cttggttact tggtttatit ccaggaaatg tgatgggcgc 2400
agaagcgggt gctatTTTTg ccatcttcac aggtcaagct t 2441

```

<210> 10

<211> 3480

<212> DNA

<213> Enterococcus faecalis

<220>

<223> Designated as EF-7

<400> 10

```
aagcttctag cgtttcggat tggcgcctat gatgcaccag gagagcgacg aatcaatacc      60
aaaaatatgc ciacagcagg aggactigca atctacattg cttttgctag ttcatgttta      120
ttgatttttc gticgattat cccacaagat tataatttggc cgattatfff ggcttggtgga      180
atggttgttt tgacaggcct cattgatgat attaaagaga ttactccaat gaaaaaaaca      240
atcgggtatff tgttagcagc attagttatt ttatffttgtt gctggaattc ggatagattff      300
tgtgacgttg ccagttgttg gaatgattga ttgcgctgg tttagtttac cactaactff      360
attgtggatt ttagcgatta cgaatgcagt aaattttaatt gatggtttgg atggtttagc      420
atcaggcgta tccattattg gattaaccac gattgggtatt acagggtatt ttttcttaca      480
tgctaaaacg gtctatatcc caattgttat ttttatffta gttgcgagca ttgcgggatt      540
tttcccatat aattffttatc cggctaaaat atttcttagga gataccgggg cgttatttct      600
cgggtfftatg attgcagtaa tgtcgttaca gggcttgaaa aatgctacgt ttatttacggt      660
aattacgcca atgggtgattf taggtgtgca attacggata cggtfftatgc aattattcga      720
cggctattga acaagaagcc catttctca gcagataaaa tgcatttaca tcaccgcttg      780
ttatctfftag gttttacceca taaagggggcg gtcatgacta tttatgcatt agcgfftagtt      840
ttttctfftg tctctffttatt gttcagctat tcaagtacag tagcatcaat tttatttaatt      900
gtctffttgtt taattggctt agaactattc attgaactaa tcggctctagt tggcgaaggg      960
catcaaccgt tgatgtatff gttacggattf ttaggggaatc gtgaatatcg tcaggagcaa      1020
atgaaaaagc gacttggcaa gcatttctaag agaaagtaaa gaaatcttta ggttgcffttg      1080
cgagagctaa acctatgata taattccatt aaacttaaaa aagtatatgt gtgaaacata      1140
tgctffttfftt ttaagacgat gtttcagtag taaggagaaa tgagcatgca agaaatggta      1200
acaatctcga ttgtcactta taatagtcgt tacattfftta atgtactaga ccaatttaaaa      1260
gccgaactag gtactgatag tatctatgat attcataatct atgacaatca ttttgaaaaa      1320
```

gcgtatcttg aaaaattaac aacatatgaa ccatittatta ctatccatcg cgctgaagaa 1380
 aatcaagggg ttggatcagg tcataatcaa gigtatttca atgcttcgac aaagtaigca 1440
 attatitttta tcccgatgtg ttggttacta aagacgtgct tgatcgittat tagacgtatc 1500
 aaatagataa gaacattgca gtcggtagcc ctaaagtigt taaatgaaga tggcacgacg 1560
 caatatttag ttctgcaaaa attagaigtc ttcgattata tgttacgttt tattcccttt 1620
 caatttgtaa agaaaaatit tgataaacgt ttgagtattt atgaatgtcg cgatttgcg 1680
 gatacagaaa caacggatat taaaatgggc tcaggctggt ttatgttgat tgatcgtgaa 1740
 aaattcgttg aaattggtag gticgatgaa cgtttcttca tgtactttga agacaacgat 1800
 ttatgtttac gcittggcaa agcaggctat cggattctct atacgccttt tgaaacggtt 1860
 gttcacatgt atgaaaaggg cgcccataaa agtcgaaaat tgtttaaaat ctttatgcaa 1920
 tcaatgggga aatittttta caaatggggc tggaggttct tttaatgagt caaagattag 1980
 cggtagtcat cgtcttata caaatgaaaa tggctgatac gccgaattat ttgttattaa 2040
 aagaagtggg agaccacccc caattgcact tatttattta tgacaacagt ccacttcctc 2100
 aagaagaigc attatittta caaccaaatg ttacttatcg acataatcct gataatccag 2160
 gactagcgac cgcttataat gaagcgattg cttttagtca agcgaatcaa tgtgaattat 2220
 tgttgctcct tgaccaagac acagaagtgc cagcctctta ttttgatacg ttgatcatca 2280
 tgccattaga tccgactgtg gcagictatg ttccaatigt agaagcaaat ggacaacaaa 2340
 tttcgccagt atatagtat caatacgttg ggcttaaagg agcaaagcca acagcaggga 2400
 tagccaacca accgttgatg gctatcaatt ctggtagagt tattacggca gaaacgctac 2460
 gctgggttga aggattttcg gaagaatttc ctttggacta ttttagacat tggttctttt 2520
 atcaattaaa tcaagccaat aaaaagattg aagtcttacc aatccacctt aaacaagaat 2580
 tgtctgtttt agattatcgt acaatgagtc ctcaacgtta tcgctctatt attgaagcag 2640
 aaacgttatt ttatcgtcga tatgatcaag aaaagttttc ccatcatcga cgccatttat 2700
 ttttacgcag tagtaagcaa tttttaactg tcaaaaaatcg ccaaatttgg cggcaaacat 2760
 tggcagaait tctcaagtta atgaaaggat aatctatgat cttagtttgt attgcgacat 2820
 ataattggaga aaaatatctc gcggaacaat tagatagtat tcttttaca gtcagtgaag 2880
 aagatgaact aattatttca gatgatggtt ctactgatca tacgttggaa attttgagga 2940
 cgtatgcagc gaattatccc caaatccaat tgttacaagg tcccagggca aggagtgatt 3000
 gctaatittg catittgcct tacgcatacg aaaggcgaag taatatittt agcagatcaa 3060

gatgatgttt	ggttgccaaa	taaagtaacg	acggtgacag	aatatittga	agcgcaccct	3120
gacatccaag	tggttatlag	tgacttgaaa	attgttgatg	cggatttaca	agttaccaat	3180
ccctcttatt	taagtittga	aaagtcaaac	cagggttttg	gcgaaatgcg	ataaaaagtg	3240
gctatatggg	ggcaggtatg	gcctttcgtc	aagaaatgaa	aaacgtcatt	ttaccatttc	3300
cgccagaagt	tcctatgcat	gatatgtgga	ttggcttatt	agctgcacgg	aagaagcaaa	3360
cgggtctcat	taaagaacca	ttagtgcttt	accgaagaca	tggagcgaat	gtcagcccca	3420
ttattaccaa	aacaagtitt	caacaaaaat	taaattggcg	tgtgaattta	ttaaaagctt	3480

<210> 11

<211> 3615

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Designated as EC-24

<400> 11

aagcttttct	tgcgtgttct	tgtgaggctt	ctttcgccat	tatcatcacg	atccacataa	60
ataaagccgt	agcgcttaga	catttgtgaa	tgagatgcac	tgactaaatc	aattggcccc	120
caactgggtgt	accccataat	atccacacca	tgggcaatcg	cttcatittac	ctgtaccagg	180
tgatcgtttta	aataggcaat	tcgataatcg	tcttgtatcg	aaccatccgc	ttcaacgctg	240
tcttttgcgc	ctaataccgtt	ctcgacaata	aataacggtt	tttgataacg	atcccaaagc	300
gtattttaaca	gaacccgtaa	tccaaccgga	tcaatttgcc	acccccactc	tgaacttttc	360
agatgcggat	tggggatcat	attcagtaig	ttgccctgcg	catittttatt	aatgcttttcg	420
tcttggggaac	acaaccagtc	atgtataact	aaagagatga	atcgacggta	tgtttttaaat	480
ctctgcgtca	ctttcagtca	tctcaatggt	gatatgttgg	tcgcggaaga	aacgctgcat	540
atagccggga	tactggccac	gcgcctgaac	atcaccaaag	aacatccagc	gccggttctc	600
ttccatggcc	tgcaacatat	cctgtggctg	gcaggtgagg	gggtaaacca	gcccaccgag	660
aagcatattg	ccgatttttcg	cttcggggag	caggctatga	caggctttaa	ctgcccgcgc	720

actggcaacc agttgatggt ggatagcctg ataaacttcc gcctcgccac tctcttctgc	780
cagccccacg cccgtgaatg gcgcgtgtaa cgacatgttg atttcattaa acgtcagcca	840
taacgccact ttatgttggg agcgagtaaa gaccgtgcgg gcgtaatgtt cgaagtgaic	900
gatgaccgct cgattagcca accgccgtag tttttcacca gcccatatgg catttcgtaa	960
tgggataacg ttaccagcgg ctgatcccc gcctgcgcca tticatcaaa cagccgatcg	1020
taaaacgcta accccgcctc attcggttcg acttcgtcgc cctgagggaa aattcgcgcc	1080
caggcaatgg aaatacgcag acaggtgaag cccatctcgg caaataacgc gatactttcc	1140
gggtaacggt gataaaaatc gatggcgaca tctttgatat tctctttccc caggatgcgc	1200
ggttccatit tttccattac gcatgaggct gtaaatciga ggtcgagatc cctttgccat	1260
cttcttgcca ggcaccttcc acctgattgg cagctgttgc ggcaccccaa agaaatgttt	1320
ctggaaatgc tttcataatt aactcctttt atcgtttagcg aatgatggat aacagcggtt	1380
cacctgcgct tatctgcgcc gtgccgtggg gtaatacgtc cgtlaaatca tgcctattac	1440
tgattaaatac cggcgtcgtc agatcaaatc cggcctcgcg aatagcaggg atatcaaaag	1500
aaatcagccg atcgccigtg ttgaccttgt caccacggtt gacgtgagcg gaaaagaatt	1560
tgccgtccag ttttacgggtg tgcataccga catgaatcag gatctccaca ccatcatctg	1620
actcaatgcc aatggcgtgt aatgtggcga acaacgaagc aattcgacc gcaaccggag	1680
aacgcacttc accaaccgag ggcagaatgg caataccttt acccaacagg ccactggcaa	1740
acgtggatc agcgacgtga atgagcgaca caatctctcc cgtcatcggg gaacagatac	1800
cgccttgctc aggtgggtga ataacctctg gtgttttctc ttcggggcac cctgcgctgg	1860
ctgacgttta gcggtgatga aatgaagcat caccgtaccg acaaatgcgc aaccgatggc	1920
aatgacaccg ccaataacgc tggcccagac ggtgaaatca attcccgttg acgggatggt	1980
ttgcatgaag gtagaaaatc ttggcaaacc aaaggagtag actttcgttt gcgcgtagcc	2040
aataatgggtg gccccaaag ccccatgat acaggcgata acaaaggggt acttacgcgg	2100
caggttgacg ccatataccg ctggttcggt gataccaaac agactcgtca acgccgtga	2160
tcccgccacc acttttttct gcgcctcgcg ttgcagagg aagacgccga gcgccgcccc	2220
gacctgcgcc ataatggcgg gcatlaacag cgggatcatg gtgtcgtagc ccagcacggt	2280
gaagttattg atacacaccg gcaccaggcc ccagtcagt ccgaacatga cgaagatttg	2340
ccagaagccg cccattaccg cgcgcgcaaa tgcaggaacc gcctgataaa gccagagata	2400
accggcggca atcagttcgc ttatccaggt tgatagcggc cccaccagca gaaaggtgac	2460


```

gggtgtgata accatcagac atagcaatgg tgtgaagaaa tttttgattg ccgacggtaa 2520
ccacgcattt agtcggcggtt ccagaatgct gcacaaccag gcagaaaaaa taatgggaat 2580
aaccgatgac gagtaattca acaatgtgac cggaataccc aggaaatcca gccccagcgc 2640
atccgctttt gcgcgtttct gaaaagcagt acagaattaa tggatgcact aacgctccac 2700
caatcaccat ggcagtaaat ggattatcgc cgaagcggtt ccccgcggtg tatcccagga 2760
ttatcgggaa gaacccaaac aaggcatcac tggcgctgaa taaaattaaa taagtaccac 2820
tttgttcggg cgtccactga aaagtgagec ccagagccag catacctttc aagatccccg 2880
gttgcgcc atcaaaccga tacagaggcg taaaaatacc tgaaataaca taaacaaagc 2940
ggtttagaca gattaccitt atcatacatt ttccgggtgc tgttgcgttt ttctgtcaag 3000
gcctgccaca ctgttaaccg ccaggaagac atcgccaca tggttaccta tgaccacctg 3060
aaactggcca ccgctttcca ccaccataat aataccgggg gtctttttca gtacctctgc 3120
ttgcgctttg ctttcatcct ttaattttaa aacgtaaaac gcgttgcgca atgcatcaga 3180
ctcacaatgt tatctgcgcc cccgactcct gcgactatit ttctggctaa ctccgtcata 3240
acttgccttc tacgctttgc ggcaaaactc caaaaaaaaa cctgaaaaaa acggcctgac 3300
gtgaatcaag caattttttt caggttttgc ccgcttagig cggtaacaat cctttactca 3360
gtaataatat ttcagtgttc ttgcgcacg cgctctatat ttatggctaa aaacataatc 3420
tctgcgggtg aaatttttac ttgatactgc aaaccaataa aaatggcgat ccgttccgca 3480
cattgccatg ctgcgggta attttgtttt actgcttgtt gtaatgaitc atcactatcg 3540
ttaattgaag catgttcaag aatagccag gataaaaact tcagatgtgt aaccagtcgc 3600
tgataactca agctt 3615

```

<210> 12

<211> 4954

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Designated as EC-34

<400> 12

```

aagcttaacc gctctcatct gttgaccgca cggcatagct atattctgcc ggtcctggga      60
cgtagcgaga ttgacatgca aaaaaacggt gcgcaggcgg taaccgttga ggattcaatg     120
tcgatgattc atgcctcgcg tggcgtgtta aaaccgcgcg gtgiaatgct gaaatcagag     180
tgtgcagtgg tcgcgggaat cgcgcaggca gcactacccc agagcgtggg agcctgggag     240
taictgggtg aagattatga tcgcattcgc aatgacattg aagctgtgct gccagagttc     300
gccgactata accagcgcat ccgtcatccc ggtgggtttc acctgataaa tgcagctgct     360
gaaaggcgct ggatgacgcc gtcaggtaag gctaatttca ttaccagcaa agggctgtta     420
gaagatccct cttcagcggt taacagtaag ctggctcatgg cgacagtacg cagccacgat     480
cagtacaaca cgacgattta tggtaaggat gatcgctatc gaggggtatt cgggtcaacga     540
gatgtggctt ttatgagtcg taaacaagct aaaatttgcc gtgtaaaaaa cggcgaaaga     600
gttaatctta ttgcgcttac gccagacggt aagcgcagtc acgccgatg gatagattaa     660
aagtggatcat ttaccctatg gctgaccgct cactggtgac ctattttcca gaatcgaatc     720
acatgctaac acttgataac cacgatccat taagtggcat tccgggctat aaaagtattc     780
cgcttgaatt agaaccatca aattaatgtc tcttctcatt tcttctgctg tcatccgcac     840
agcagaagaa ttcctcattg actattatct cgcaatttgc tcacatggat taaattaaac     900
tacatactat aagatatata cttctgccta cagctgttaag aaactccgct cagtactgaa     960
gcaccagttc tatttcctct tttctccagc ctgttatatt aagcactactg attaacgatt    1020
tttaacgtta tccgctaaat aaacatattt gaaatgcatg cgaccacagt gaaaaacaaa    1080
atcacgcaaa gagacaacta taaagaaatc atgtctgcaa ttgtgggtgt cttattactg    1140
acacttacgt gatagccatt ttttcggcaa ttgatcagct gagtatittca gaaatgggtc    1200
gcattgcaag agatcttaca catttcatta tcaatagttt gcaaggctgt aaacaaacag    1260
caaattataa atatgaaatg ttaaaaaagt atcgataaaa actttattgt tttaaggaga    1320
taaaatgtcg ctcgtttgtt ctgttatatt tattcatcat gccttcaacg ctaacatttt    1380
agataaagat tacgccttct ctgacggcga gatcctgatg gtagataacg ctgttcgtac    1440
gcattttgaa ccttatgagc ggcattttaa agagatcgga ttactgaaa ataccattaa    1500
aaaataicta caatgcacta acatccagac agtgacgggtg cctgttcctg cgaagttttt    1560
acgtgcttca aatgtaccga ctggattgct taatgaaatg attgcttata tcaactcgga    1620
agaacgcaat catcataatt tttcagaact ttgtcttttt tcttgccctgt ctatttttgc    1680

```

cgcatgcaaa	ggtttcatta	cactattaac	taacgggtgtg	ctatccgttt	ctgggaaagt	1740
gagaaatatt	gtcaacatga	agccggcgca	cccatggaag	ctgaaagata	tttgtgactg	1800
cctgtacatc	agtgaagcc	tgttgaagaa	aaacttaagc	aagagcaaac	gacattctca	1860
cagattcttt	tagatgcaag	aatgcagcac	gcaaaaaatt	tgatacgcgt	agaaggttca	1920
gtcaataaaa	ttgccgaaca	atgtggttat	gccagtlacat	cttattttat	ttatgcgttc	1980
cgcaaacatt	tccgcaacag	tccgaagaga	gtttctaagg	agtaccgttg	tcaaagtcac	2040
acgggtatga	atacgggcaa	cacgatgaat	gctttagcta	tttgattatt	tgctaacgag	2100
tagtcaacca	cacacgctgc	giaagaatta	aatggggcag	ccattccctg	ccccgcgttg	2160
tttttaggcg	atataattat	tgaaataaat	aagtgcacac	catcacatat	ttatgcactt	2220
gcataacctg	ttgcatgatt	atttatgac	tcaattctgc	attttgtcag	taaaatgcaa	2280
taatttatta	aatatcaata	aattagtgt	ttatcggcga	gaaattacit	aatagaacag	2340
aaagtaatgt	caacgcitaa	tggactgttt	tttccctttt	tttagctaaa	tctgctatct	2400
ctttatgtga	ctaacttcac	ttacatccac	ttatttctct	tcgtaaaatt	actttggaat	2460
taagtacaat	aagaagagga	acatttatga	agtcctgcatt	aaagaaaagt	gtcgttaagta	2520
cctcgataac	tttgatactg	gcatctggta	tggctgcatt	tgctgcicat	gcggcagatg	2580
atgtaaagct	gaaagcaacc	aaaacaaacg	ttgctttctc	agactttacg	ccgacagaat	2640
acagtaccaa	aggaaagcca	aatattatcg	tactgaccat	ggatgatctt	ggttatggac	2700
aacttccitt	tgataaggga	tcitttgacc	caaaaacaat	ggaaaatcgt	gaagttgtcg	2760
atacttacia	aatagggata	gataaagcca	ttgaagctgc	acaaaaatca	acgccgacgc	2820
tcctttcatt	aatggatgaa	ggcgtacgtt	ttactaacgg	ctatgtggca	cacgggtgtt	2880
ccggccccct	ccgcgcgcga	ataatgaccg	gtcgagctcc	cgccccgttt	ggtgtctatt	2940
ccaataccga	tgctcaggat	ggtattccgc	taacagaaac	tttcttgcct	gaattattcc	3000
agaatcatgg	ttattacact	gcagcagtag	gtaaatggca	cttgtcaaaa	atcagtaatg	3060
tgccgggtacc	ggaagataaa	caaacgcgtg	actatcatga	caccttcacc	acattttctg	3120
cggaagaatg	gcaacctcaa	aaccgtggct	ttgattactt	tatgggattc	cacgctgcag	3180
gaacggcata	ttacaactcc	ctttcactgt	tcaaaaatcg	tgaacgtgic	cccgcaaaag	3240
gttatatcag	cgatcagtta	accgatgagg	caatiggcgt	tgttgatcgt	gccaaaacac	3300
ttgaccagcc	ttttatgctt	tacctggctt	ataatgctcc	gcacctgcca	aatgataatc	3360
ctgcaccgga	tcaatatcag	aagcaattta	ataccggtag	tcaaacagca	gataactact	3420

acgcttccgt ttattctgtt gatcagggtg taaaacgcat tctcgaacaa ctgaagaaaa 3480
 acggacagta tgacaataca attattctct ttacctccga taatgggtgcg gttatcgatg 3540
 gtccctcggc gctgaacggg gcgcaaaaag gctataagag tcagacctat cctggcggta 3600
 ctcacacccc aatgtttatg tgggtggagaa ggaaaacttc aacccggtaa ttaagacaag 3660
 ctgatttccg caatggattt ctacccgaca gctcttgatg cagccgatat cagcattcca 3720
 aaagacctta agctggatgg cgtttccttg ctgcccgggt tgcaagataa gaaacaaggc 3780
 gagccacata aaaatctgac ctggataacc tcttattctc actggtttga cgaggaaaaat 3840
 attccattct gggataatta ccacaaattt gttcgccata cagtcagacg attaccgca 3900
 taaccccaac actgaggact taagccaatt ctcttatacg gtgagaaata acgattattc 3960
 gcttgctlat acagtagaaa acaatcagtt aggtctctac aaactgacgg atctacagca 4020
 aaaagataac ctgcccggc ccaatccgca ggctcgttata gagaigcaag gcgtggtaag 4080
 agagtttata gacagcagcc agccaccgct tagcgaggta aatcaggaga agtttaacaa 4140
 tatcaagaaa gcactaagcg aagcgaaata actaaacctt catgcggcgg attttccgc 4200
 cgctttattg agcgagatag cgatgcacgt tacagccaag cctccagtt ttcaatgtaa 4260
 tctcaaatgt gattactgtt ttaccttga aaaagagtcg cagtttactc atgaaaaatg 4320
 gatggatgac agcactttga aagagttcat caaacaatat atcgacgcgt ctggcaatca 4380
 ggtctatttt acctggcaag gcggtgaacc cactctggct ggcttgatt ttttccgtaa 4440
 agttattcac tatcaacaac gctatgcagg ccaaaaacgt atttttaatg cattacaaac 4500
 gaatggcatt ttattgaata atgaatgggt tgccttctca aagaacatga atttctgggtg 4560
 gtatctcgat cgatggcccc caggagttaac atgaccgita cagacgcagt aattcaggta 4620
 acggiacttt tgcaaaagtg atagcagcca tcgagcgtct gaaatcataat caagtagagt 4680
 ttaatacgtt aaccgicatt aataacgita atgtccatta cctcttgag gtttatcatt 4740
 ttttaaaatc tatcggcagt aaacatatgc aatttatcga attgctagaa accgggacgc 4800
 cgaatatiga tticagtgggt catagigaga acacattccg tatcattgat ttttctgtgc 4860
 ctcccacggc ttaaggcaag tttatgtcaa ccatttttat gcaatgggtt aaaaacgatg 4920
 tgggtgaaat ttatcatcgt cagtttgaaa gctt 4954

<210> 13

<211> 3796

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Designated as EC-39

<400> 13

```
aagcttaatc gcgtgaatca ggagtaaaaa aatgacaacc cagactgtct ctggtcgccg      60
ttatttcacg aaagcgtggc tgatggagca gaaatcgctt atcgctctgc tggctctgat      120
cgcgatigtc tcgacgttaa gcccgaacit ttaccacatc aataacttat tcaatatctt      180
ccagcaaacc tcagtgaacg ccattatggc ggtcgggatg acgctggatg tccctgacgtc      240
gggcatecac ttatcggtag gtctctctgtt ggcgctgacc ggcgagttg ctgcatttat      300
cgtcggcatt gaagtcaatg cgctggatggc tgcctcctgt gctctcgcgt taggtgcgca      360
attggtcggg taaccggggg gattgttagcg aaaggctcgc tccaggcggt tatcgctacg      420
ctggttatga tgcctttact gcgcggcgctg accatgggtt ataccaacgg tagcccagtg      480
aataaccggc ttactgagaa cgccgatctg ttggctgggt ttggatttgg tcgtccgctg      540
ggcgctaccg cgccagctct gatcatgggg attgctctcc tcgcggcctg gtacatgctg      600
catcacacgc gtcigggggc ttacatctac gcgctggggc acaacgaagc gacaacgcgt      660
ctttctggta tcaacgtcaa taaaatcaaa atcatcgtct attctctttg tggctcgtctg      720
gcatcgctgg cgggatcata gaagtggcgc gctctctctc cgcacaacca cggcgggggac      780
tggctatgag ctggatgcta ttgctgcggt ggttctgggc ggtacgagtc tggcggggcgg      840
aaaaggctgc attgttggga cgttgatcgg cgcattaat cttggcttcc ttaataatgg      900
attgaatttg ttaggtgttt cctcctatta ccagatgac gtcaaagcgg tggatgtttt      960
gctggcgggt ctggtagaca aaaaaagca glaataacga ctacaggcac atcttgaata     1020
tgaacatgaa aaaactggct accctgggtt ccgctgttgc gctaagcgcc accgicagtg     1080
cgaatgcgat ggcaaaagac accatcgcgc tggtggtctc cagcttaac aaccgttctt     1140
ttgtatcgct gaaagatggc gcgcagaaag aggcgataa acttggctat aacctggctg     1200
tggactccca gaacaacccg gcgaaagagc tggcgaacgt gcaggactta accgttcgcg     1260
gcacaaaaat tctgctgatt aaccgaccg actccgacgc agtgggtaat gctgtgaaga     1320
```

tggttaacca ggccaacatc ccggttatca ctcttgaccg ccaggcaacg aaaggigaag 1380
tggtgagcca catigcttct gataacgtac tgggcggcaa aatcgctggg gattacatcg 1440
cgaagaaagc gggigaaggt gccaaagtta tcgagctgca aggcatigct ggtacatccg 1500
cagcccgiga acgtggcgaa ggcttcacgc aggccgttgc tgcacacaag tttaatgttc 1560
ttgccagcca gccagcagat ttgatcgca ttaaagggtt gaacgtaatg cagaacctgt 1620
tgaccgctca tccggatgtt caggctgtat tcgcgcagaa tgatgaaaig gcgctgggcg 1680
cgctgcgcgc actgcaaact gccggtaaat cggtatgtgat ggctgcgcga ttgacggta 1740
caccggatgg cgaaaaagcg gtgaatgatg gcaaaactagc agcgactatc gctcagctac 1800
ccgatcagat tggcgcgaaa ggctgcgaaa ccgcagataa agtgcigaaa ggcgagaaag 1860
ttcaggctaa gtatccggtt gatctgaaac tggttgttaa gcagtagttt taatcaggtt 1920
gtatgaccig atggtgacat aaatacgtca tcgacagatg aacgtgtaat ataaagaaaa 1980
gcagggcacg cgccacccta acacggtggc gcattttatg gacatccga atatgcaaaa 2040
cgcaggcagc ctctgtgttc ttggcagcat taatgctgac cacattctta atcttcaatc 2100
ttttcctact ccaggcgaaa cgtaaccggt aaccactatc aggttgcat tggcggcaaa 2160
ggcgcgaatc aggtgtggc tgcctggcgt agcggctgca atatcgctt tattgcctgt 2220
acgggtgatg acagcatiggt tgagagcgtt cgccagcagc tcgccactga taacattgat 2280
attactccgg tcagcgtgat caaaggcgaa tcaacagggtg tggcgtgat ttttgttaat 2340
ggcgaagggtg agaatgcat cggattcat gccggcgcta atgctgccct tccccggcg 2400
ctgggtggaag cgcaacgtga gcgtattgcc aacgcgtcag cattattaat gcagctggaa 2460
tcaccactcg aaagtgtgat ggcagcggcg aaaatcgccc atcaaaaataa aaactatcgt 2520
tcgcttaacc cgctccggct cggaacttc ctgacgaact ctgcgctgtg gacattatta 2580
cgccaaacga aacggaagca gaaaagctca ccggtattcg tgttgaaaat gatgaagatg 2640
cagcgaaggc ggcgaggga cttcatgaaa aaggatatcg tactgtactg attactttag 2700
gaagtcgtgg tgtatgggct agcgtgaatg gtgaaggta gccggttcct ggattccggg 2760
tgcaggctgt cgataccatt gctgccggag ataccittaa cggctgcgtta atcacggcat 2820
tgctggaaga aaaaccattg ccagaggcga ttctgtttgc ccatgctgcc gctgcgattg 2880
ccgtaacacg taaaggcgca caaccttcg tactgtggcg tgaagagatc gacgcatitt 2940
tagacaggca gaggtgacgc ttggctacaa tgaagatgt tgcgcgctg gcgggcgttt 3000
ctacctcaac agttctcac gttatcaata aagatcgctt cgtcagtgaa gcgattaccg 3060

```

caaagtgagc gcgattaaag actcaattac gcgccatcag ctctggcgcg tagcctcaaa 3120
ctcaatcaaa cacataccat tggcatgttg atcactgcc a gtaccaatcc tttctattca 3180
gaactgggtgc gtgtcgtiga acgcagctgc ttccaacgcg gttatagtct cgtcctttgc 3240
aataccgaag gcgatgaaca gcggatgaat cgcaatctgg aaacgctgat gcaaaaacgc 3300
gttgaatggct tgcigtact gtgcaccgaa acgcatcaac cttcgcgtga aatcatgcaa 3360
cgttatccga cagtgcctac tgtgatgatg gactgggctc cgttcgatgg cgacagcgat 3420
cttattcagg ataactcgtt gctgggcgga gacttagcaa cgcaatatct gatcgataaa 3480
ggcataacce gtatcgctg tattaccggc ccgctggata aaacccggc gcgctgcggt 3540
tggaaggtta tcgggcggcg atgaaacgtg cgggtctcaa cattcctgat ggctatgaag 3600
tcactgggtga ttttgaattt aacggcgggt ttgacgctat gcgccaaactg ctatcacatc 3660
cgctgcgtcc tcaggccgtc ttaccggaa atgacgctat ggctgttggc gtttaccagg 3720
cgttataica ggcagagtta caggttccgc aggatatcgc ggtgatggc tatgacgata 3780
tcgaactggc aagctt 3796

```

<210> 14

<211> 6914

<212> DNA

<213> Enterobacter cloacae

<220>

<223> Designated as ET-49

<400> 14

```

aagcttttcg agttcgccat ccggcaacag ctacactgagc ttttacgcgc ccagggtgcc 60
tttgaactca atcccagct cagtaaggcg gtccatgaata atctctttgc gagatttttc 120
actggtaccg gcatcagggt ttgcagggtt cagctcgcca ccagcctcgc ccttcacag 180
ccggacgtta gacttcagcg ccgggtgaag atctttcaac tccaccacgt cgccaacctt 240
tacgccgaac catgggcgca caacttcgta tttagccatg ctgtttcctt acgccagggt 300
agcgccgtag acaacgccag acaggcctga tcgtctgcag taatttgcag gccctcagca 360

```

gacatgatct	ggaagtigia	gttaacgita	ggcagtgggc	gcggcagtgg	cacaacgcca	420
acagccatac	ccaccagtgg	ggagatcacg	tcacgacgac	gaacgtacgc	gataaactcg	480
ttaccggica	gcgcgaagtc	atgcggatct	ctttcaccgg	tgcgaatggc	agaacagcct	540
gcaggagagt	gccgcicacc	acaccatlaa	ctacgiatgg	ctgagccata	tttgcccaga	600
tctcagggga	aaccacatc	acatcatact	gagctacttt	gttggtgcgt	gcggitggtac	660
cgaatgcicc	tttaccaaag	aactcaaaat	attgagtcgt	ggttgcgctg	gtcaggtcga	720
tgttcgcacc	accagcacca	gaaccgaggt	taatcttctt	ggtgttgccg	tggttcttga	780
tgccttcgcg	cgggtaggac	tgaacctgaa	tttttgaatc	gccgttcagg	tagtagttga	840
cgcgcttctg	gttgaacttg	cgcactttcg	ccatctgcga	aiccagaacc	agatcaatgc	900
ctacagagtt	aaggccagca	gcatgacgcc	agttaacacc	gtagccagca	gtgaacaccg	960
gaatcgggtc	gccatcgctc	gcgtagtcag	tgtggtcgaa	ggagaatggc	gcctgaccat	1020
cgatgcttac	tgacacgtcg	tcagcgatgt	cgccgaccac	gttatacagc	ttggcggttt	1080
taccaaccgg	cagcacggtc	tgaacgccga	tcaggtcgtt	tacgatttcc	atgccaactt	1140
cctgatcccg	cagctgcagc	acctggttgt	caatctcagc	ccagaagtca	cgggagaaac	1200
cgccaacagc	gttacaagcc	agcatgtcag	gcgtcatcat	tgcgcggtta	gctgcaatga	1260
tggaatcggt	ctgtaggttc	cacatgttgc	ggtttgccca	cagctcactc	cagtgcgccg	1320
cgaggcggga	gttagtcgcc	agcgtctctt	tagagaagta	catatgtgtt	tgtccttttg	1380
ttacgcgcca	gctgcggcga	cagtgccaac	gcgcatacgc	acgcgaatga	agtcagtggc	1440
gctggccgcg	atggtgtatt	catcctggct	gtagccgata	actgaatcag	tgtcggatgt	1500
ggcaagggtta	aactgaccgg	cagttcccag	cttgatcggg	ctgtcttttt	tatacgcacc	1560
aggcaggcag	cgcagcgcca	gctcacgacc	ttcttcgacg	tagttaccta	ctgccgaatc	1620
cccggcaggg	atttcttcgg	tgatitgtcag	gcccigtgtga	taaccgacat	cgatgatgta	1680
caggcggccg	gttagcgcgg	tggcctgagc	gaatttatcg	gatgagttga	tggttgcggc	1740
ggtgccagga	agcaaccggg	cggccgttgt	gcgggtttcg	gtcttgtaca	gagactgacc	1800
gtcgatatata	acgcgacgat	aacgtggcat	tattccggct	ccttacttga	agtgttcgtc	1860
tgcggctggc	gcgccggttt	ctttgtgtcg	ctgagcattg	ttggtgccca	gcgacttgaa	1920
catcgcgtcc	agagcttcgc	ctgacagagc	gttcgcgagc	gatatcgcca	tggaccttcg	1980
caaccgcctc	gcgctttgct	ttctcttcgg	cacgggagtt	cgcggtaagg	gtttccgcga	2040
gttgcttctg	attggcctgc	agcgcatcaa	ccttttccgc	gagaggctta	atagccgctt	2100

cagiatitggt	cgcaacagcc	iggccgatca	tgctgccgat	tigticcagt	tcttcttigg	2160
ttaaaggcat	gtgcctccg	ttttgtggtt	tggigcaggc	gttccctgcg	gtgtgaatag	2220
agctitgaat	tgttagcgac	gactgccacc	cacgactcct	ggcgcgctac	tgcggttccg	2280
gtatcgtcga	tigtgatctt	cccgccatca	gcgaataccg	taaacctgag	catcaccgcc	2340
atttcgcacg	atgaccacct	gcgagtcagt	gagtcagcaa	cccaggcata	ttcatccgtg	2400
cccggcgcaa	acttggcttt	ggctgcccga	tcgagacgct	gctcgcgctc	ccggtaggat	2460
tcaccaccca	gcgcgccgga	gttcgcttta	agcggctgcg	ccagatcggc	gtttaccatc	2520
aggccaacgc	cctgctcagg	ggtggcggct	ccgacttcgt	gcagtaggat	cgcgtcgtgg	2580
tccatgctgt	gaatcttcgc	caccactcgc	gcaccctag	ctctctgttg	ttcgttaggc	2640
tcaagctggt	cgaggaaagc	ggcgacactg	gtatgaatcg	gcggaacgtc	atcgccgcgc	2700
tcgatggctg	cgacgcgctc	aagtagttct	cggccacctt	cagactcacc	ggcgcgggca	2760
acatcaaccc	acttttcgag	gtagatacga	ttaccggact	tcttaacgtt	gcggttccac	2820
gcgccgatat	ggcctgcgtt	aatccccctc	ggggagaaag	cagacacgaa	ctgaccatta	2880
acctgagggt	ggcccagcgg	cgccagggia	ccttccagcc	ccttatagtg	ggcgtcgatt	2940
tgctcttgcg	tgtacaagcc	gccattcatg	acgacgttag	ctggaagtgt	gtagctcggc	3000
agcaccaggt	gctcacgccc	gttgtatgtt	tcgcgccgga	tagactggct	gttcaccttt	3060
gtggigtatgt	tgacctgaat	atgctcacca	tgtttcgggtg	cctggattgg	acgctgtgct	3120
tcgtggttta	cctggaaattt	catgagttaa	ttctccgccc	aggcgtaacc	gctcgcctgc	3180
atcgatttaa	attcctgttt	gagtttcgtg	atgggtgccg	ggtattccgg	cttgccgtcc	3240
gcattccacca	gcaccgactg	ctggctgcat	ttgcagtiga	tggagtggcc	atcttltgtg	3300
taccagtcac	gcacctcttc	gttgggtgtg	aggtgggcat	gggcgcactg	cgtgggtatg	3360
tcgcgttgic	ggcgacagag	ctgagatgtg	aaccagcagc	gttttaaggc	cgaacaggtc	3420
attcgectct	tggctttcat	cccacttggc	ccggcgcagc	gcggtagtca	cttcagtgcg	3480
tgtatccgg	ttagcccggc	gtttctcgat	gccggctctg	tcgttcaggt	tgcgggcaat	3540
gtccagagga	ttgagcccgc	gcccacacc	atcagtaaga	cacgcgccat	gtcgcgctta	3600
acgtcagccg	tcagcccttt	catlctctca	aatacacgcg	catgcaccag	cgccatgcgt	3660
ttctgatact	ggtcgcttgc	gaggatggag	gccagcgact	cacgcccggc	tgcgtacacc	3720
ggggatigct	gactgagggt	gtagaacgac	tgcccggtcc	ctttttccga	agccagatcg	3780
atgtactcgt	aaaaccacag	gtcgtaatcg	ccacctcaa	gcagtacctg	atcaaccagg	3840

taactggcat	cgttcaggat	gatggagagt	agcattgggt	ttagctggta	ttcgtatctg	3900
gcgtttactg	cgagggagga	aggtattttg	ttagagtctg	atttgtacgc	cttgccaatc	3960
ttattcatcc	gcciggcgaa	gtctttcatt	gcccggcggt	ccagcgcac	ggctccggtc	4020
ggatcctgat	agttacgcgg	cagaatcggt	ggcttcgtct	tcttcgtcgc	catcctcttc	4080
tcctaattga	aattcatcga	cgttttcata	accggcagca	gtagcggaatt	tcttcacgac	4140
taaaggctgg	tttttctccg	ctccccigga	acgtctgggt	aatctctgcc	atggtttttg	4200
catttgcgag	tttctcagtt	ccagtctgtt	cgttgaggtc	atcccagata	accgtcttct	4260
cgctgactgc	atcaataatt	ttcaggtcga	tgagcttgtc	actgaagtct	tcaatttcga	4320
atgacaggtc	accgcgccgt	gactggcagc	gcgcgttgaa	atatttctga	tcctcgggtc	4380
ttgccctttc	accgctcgc	atcccaacca	gaaccttcac	agggatatca	acagatgcag	4440
cgaaggtttg	caggttgacg	ttataggctg	ctgacggatc	cgctacagct	gtgaccagtg	4500
gtgtgactgt	agccccctgg	gttgtcatca	gaacatcggt	accacgggtc	atttccccgg	4560
caacttcgtt	aaacttatcc	tgcaactcgt	ccatgtcacg	ccataaagtg	acgcgagatt	4620
gttgaaatcg	atttcttct	caaagttgac	attaagctgc	cgcgcggcgt	tctttaggaa	4680
tgactcacca	gaaccaccct	cgaccttctc	aaggctgacg	caggcgttat	agccaggctc	4740
aaggaagcca	atagcatcat	tagaatagtc	accaaggata	aagacgcgat	cgggatgtac	4800
gaagcgctga	ttagttccac	cgcttggaag	gctctcaaca	tatttccact	gctttggctg	4860
cccgtagcct	gccgatttct	ggtcagttac	ccactcgcig	actgttaatg	accagccca	4920
tgcgatcgta	acctttttta	gtgacttgcc	acgaacaaca	ggctgatccc	atgttctgga	4980
atcattgata	tgcagcagga	taccgcata	acgtccgacc	tgtcggcggc	ggtctgcttc	5040
agcaaaagcc	cgccaaaggc	gctttgtgaa	aacctttttg	gtgttcttct	cccaggcagt	5100
ttcatcctta	ctctcgtcgg	catcatcacc	ctcgatgatt	tccgggttgg	tctgccagca	5160
cttgcccacc	agcttctcta	ctgcgccgtg	ggctattcca	ccgcgacgat	acagtgcgta	5220
gaggttttcg	taagtacct	gtcagggaa	tccatactcg	caccatgcgg	aatggcgctt	5280
attgtccagc	cccatgttag	gcgccaacag	ccccatacgg	gcacgggcca	tccgcgcac	5340
gttcaacgca	tggttgacgg	cgagagttaa	tttgtcagtc	atggtttgtc	cgttgggtga	5400
tttaaggcat	aaaaaaaggc	cgctttggcg	acctgttggc	tatttaaaaa	gctaaactct	5460
gttgaacgaa	ataaacataa	ctgtctcagg	cttaacgcca	taatcacttg	ccaacttctg	5520
agtgcaccca	attaagacag	ttagatgcaga	tttcgaagag	cttgcacat	aaatttcgaa	5580

```

gttttcaaat actccgccgt tgggtgtggt aatcttataat gacataaacc aatcattcat 5640
aataatciact cccttacaga attgagiaga tattatcggc aagtgcataat gtttcttttaa 5700
attatctcaa ccttttcggg atcatcatcc cggccatctg gcccttacgt ttaatgtgtc 5760
cgtcgaggct giagcgaata ccgtcccagc agtgttcgta accgtctgcc agtttaggca 5820
atacctcgcc ggtgatgcgg tccgttttgt aggaccacat gcgggcctct ctcgccacat 5880
tcttgcagcg aggatggata atgatttcgt caaagccgcg aagatgcgcg ataccgtcct 5940
caacactccc ctgccatttc tcggcagccg agatgttgaa gccctggcgc ttgagatagc 6000
tgatagtctc gggtcgggcg gagtcggcct tgatgggcca gtcacgcgat ccggggattg 6060
tgtcgtatag ctctggcata tggtcgagct ctgtctgctg accgtatgcc tcgtattcga 6120
tgtacagccg gttgtgcagg atgaacgagc gcaccagcgt gttagggctt ttggcgaaac 6180
cgaagtcagc accgaagaaa aggcgatcgg cctctttcca tagctgggtc gagaactcag 6240
cgatccggia tttaccggcc agcaccigt tcatcagagt ttcgaggtaa gcaccitccc 6300
aaacccacgc giatgttgcc gggtaagc ggcgtgatc gttctgtcgc tcaccitcca 6360
gcacgtcggg gaaccatgga ttatccgtgt agttcatctc aacgtgatac agtcgtcgcc 6420
agcctcttta cggaaacgt tatccgtgcg ctgccgtcgc gctccgggtt ccatgtcacc 6480
caaatctctg aaccttcctc acgaacggtc gggctcagct tctgccaggc tatttcgctg 6540
actgattcag cctcatcaac ccaacagagc aagatgcgcg ctttcgactt gatgctgtcg 6600
aggttatgcc gcagaccgca gaacacgtag ttaacgctct tgcgatggt gcggatgtac 6660
ttctcgccga tatcaaagt ggaagccagc cagggaacag acaggatagc ctgtttcacc 6720
tcttgcatatc tcgactcttc cagtgaattc atgaattcac gcgcacagag caccacgccg 6780
ctttcaccgt tcatcatcga ctgatacgcc tttacggctg tcatcagcgc aaaagtgcgc 6840
gtcttggcac taccacgccc accatgcgag caccggtaac gcttattctc ggcgatgaac 6900
agtggcgcaa gctt 6914

```

<210> 15

<211> 5975

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<220>

<223> Designated as KI-50

<400> 15

```

aagcttattc cacgctggag gcgtccggga ttatcggcgt caacgctatc gccggcatcg      60
ccgggaccat catcgccggc atgctctccg accgcttttt caaacgcaac cgcagcgtga      120
tggccggatt catcagcctg ctgaacaccg ccggcttcgc ccgatgctc tggtcgccgc      180
acaattacta cactgataat ctggcgatga ttatcttcgg ggccaccatt ggcgctctga      240
cctgcttccct tggcgggctg atcgccgctg atatctcttc gcgcaaggcc gccggggccg      300
cgctcggcac catcggcac gcagctacgc cggcgccggc ctgggcgagt ttctcaccgg      360
gttcattatt gataaaacgg ctatccttga aaacggcaaa acgctgtatg atttcagcac      420
gttggcgctg ttctgggtgg gtacggctcg ggttcngcgc tactctgttt taccactgcc      480
gccatcgtcg cccggcgcca tgccgtcgaa cggcagacct cgttctcctc ataaccgatt      540
aacgaataag gaagaagata tgatgccctg aagacatcag gggctgttac gcctgtttat      600
cgcttgcgcg ctgccgctgc tggcgctgca atctgccgcc gccgcggact ggcagctgga      660
gaaagtggct gagctcagcc gccacggtat tcgtccgccg acggccggca accgggaagc      720
catcgaggcc gccaccggcc gaccgtggac cgagtggacc acccatgacg gggagctcac      780
cggccatggc tatgccgccg tggtaacaa agggcgctgc gaaggccagc attaccgcca      840
gctcggcctg ctgcaggccg gatgcccgc ggcggagctg atatacgtgc gcgccagccc      900
gctgcagcgg acgcgagcga ccgcccaggc gctgggtggat ggcgcccttc ccggctgcgg      960
cgtcgctatc cattatgtca gcggggatgc cgatccccctg tticagaccg acaagtctgc     1020
cgccacgcaa accgaccccg cccgccagct ggcgcggtga aagagaaggc cggggatctg     1080
gcgcaggtcg gcaggcgctg gcgccacca tccagctatt gaaacaggcg gtttgtcagg     1140
ccgataagcc ctgcccgatc ttcgataccc cgtggcaggt cgagcagagc aaaagtggga     1200
agaccacat tagcggactg agcgtgatgg ccaataatgg ggagacgctg cgtctcggct     1260
ggagtgaana cctgcctctc agccagctgg cgtggggcaa gatcaccag gccaggcaga     1320
tcaccgccct gctgccgctg ttaacggaaa actacgatct gagtaacgat gtgttgtata     1380
ccgcgcaaaa acgcgggtcg gtgctgctca acgctatgct cgacggcgct aaaccggagc     1440
gaatcgaacg tacgctggct gctgctggtg gccatgacac caatatcgcc atggtgcgca     1500

```

cgctgatgaa ctttagctgg cagctgccgg gctacagccg gggaaatata ccgccgggca	1560
gcagccctggt gctggagcgc tggcgcaacg cgaagagcgg agaacgctat ctgcgggtct	1620
atttcagggc ccagggcctc gacgacctgc gtcgtctgca gacgccggac gcgcagaccc	1680
cgaigctgcg tcaggagtgg catcagccgg gctgccgtca gaccgatgtc ggiacgctgt	1740
gtcccttcca ggccggctatt accgccctcg gtcagcgat cgaccgatca tccgccccgg	1800
cggtagcatg gtccctgccgt agcggcgccg tgtttgtccg ggccccggaa aacctttttt	1860
tccaggccgg cagcagctcc gttatccgtt gtccggcgca aacgccccgg cggcgacctg	1920
cgccgggggtg acaccgcctg tccagcacc agccgcctat cagcccagca ggcgtgacgt	1980
cgaacgccgg attgtaaacg gtggcccccg tcggcgccca ctgtaccgcg ccgaagctgc	2040
ccgccactcc ggtcacttcc gccgccgcgc gctgtcctaat ggggatcgcc gccccgttcg	2100
ggcaatggcg gtcgagggtg gtctgcgggg cagcgacgta aaacgggatc tgggtgataat	2160
gggccaaaac cgccagagaa taggtgccga ttttattcgc cactcgcgg ttggcggcga	2220
tacggtcggc gccgaccac accgcattca cctgccccctg cgccatcagg ctggcgacca	2280
ttgaatcggc gatcagctga tagggcacgc ccagctcgcc cagctcccag gcggttaaac	2340
gaccgccctg cagcagcggc cgggtttcat caaccatac gtgggtcact tttccctgcc	2400
ggtgcgccag cgcgataacg ccgagggcgg tccctacccc ggccgtcgcc aggccaccgg	2460
tgttgcagtg ggtcagcagt cgactgccgg gcttcaccag cgcactgccc gcctcagcga	2520
tgcggtcgca cagctgttta tcttcttcga ccagacgcaa ggcttccgt tccagcgctt	2580
gcgggtaatc tccgggccag cgctgcttca tgcgatcaga ttattcatca ggttgaccgc	2640
cgctggccgc gccgcgcgca gtctccagcg cctgctggag tgcatcccgg ttcaggccgc	2700
gctgggccag cagggccagc agcaggctgg cggacaggcc aatcagcggc gcgccgcgca	2760
ccccgcaggt atgaatatgg tccaccagca gcgcaacgtt atccgccgc agccagcggt	2820
tttccctgcgg caaggcctgc tggtcgagaa taaaaagctg attttcact acccgcaggc	2880
tggtggtctg taatgtctgc atgtcgttaa atccctgttg cgttgttgta tcacattgtg	2940
tcaggatgga atccagaagt atagacgtct gaacggctta atcagaattc gaggatcgag	3000
gcaatgtcgc aataccatac cttaccgcc cagcatgccg tggcttacgc gcagagtttc	3060
gccggcatcg acanccatct gagctggctc gcgcgcagga agtgggcgat ggcaactcaa	3120
tcgtgtgttt aaagtgttcg atcgccaggc cgtcacgggc gatcgtcaaa caggctctgc	3180
cctacgtgcg ctgcgtcggc gaatcctggc cgctgacctt cgaccgcgcc cgtctcgaag	3240

cgcagaccct	ggtcgcceac	tatcagcaca	gcccgcagca	cacggtaaaa	atccatcact	3300
ttgatcccga	gctggcggtg	atggatgatg	aagatctttc	cgaccaccgc	atcttgcgcg	3360
gagagcttat	cgctaacgtc	tactatcccc	aggcggcccg	ccagcttggc	gactatctgg	3420
cgcaggigct	gtttcacacc	agcgatttct	acctccatcc	ccacgagaaa	aaggcgcagg	3480
tggcgcagtt	tattaaccgc	gcgatgtgcg	agatcaccca	ggatctgttc	tttaacgacc	3540
cgtatcagat	ccacgagcgc	aataactacc	cggcggagct	gggaggccga	tgtcgcgcgc	3600
ctgcgcgacg	acgttcagct	taagctggcg	gtggcggcgc	tgaagcaccg	tttctttgcc	3660
catgcggaag	cgctgctgca	cggcgatata	cacagcgggt	cgatcttcgt	tgccgaaggc	3720
agcctgaagg	ccatcgacgc	cgagttcggc	tacttcggcc	ccattggcct	cgataatcggc	3780
accgccatcg	gcaacctgct	gcttaactac	tgcggcctgc	cgggccagct	cggcaatcgc	3840
gatgccgccg	ccgcgcgcga	gcagcggctg	aacgacatcc	accagctgtg	gaccaccttt	3900
gccgagcgc	tccaggcgct	ggcggcggag	aaaaccgcgc	acgcggcgct	ggcttaccct	3960
ggctatgcct	ccgcctttct	gaaaaagggt	tgggcggacg	cggtcggctt	ctgcggcagc	4020
gaactgatcc	gccgcagcgt	cggactgtcg	cacgtcgcgg	atatcgacac	tatccaggac	4080
gacgccatgc	gtcatgagtg	cctgcgccac	gccattacce	tgggcagagc	gtgatcgtg	4140
ctggccgagc	gtatcgacag	cgtcgacgag	ctgctggcgn	gggtacgcca	gtacagctga	4200
gtgcgcctgt	ttccctcacc	ccaacctctt	cccacaggga	gaggagcac	ccccataaaa	4260
agtgccattt	tctgggattg	cccggcgngn	tgcgcttgcc	gggcctacag	atagccgcat	4320
aacggtttga	tcttgcactc	tttcgttagc	cgggtaaggc	gaaagccgcc	acccggcaga	4380
catgcgagta	caattttgca	tttaccttac	cctcacccca	gatactcaat	caccgatagc	4440
ccgccgttgt	aatcggtgct	gtagataatg	ccttgcgcgt	cgacaaacac	gtcacaggac	4500
tggatcacc	gcgggcggcc	gggacgggta	tccatcatte	tctcagcgca	gccggcacca	4560
gcgccccggt	ctccagcggg	cgatacgggt	tggaaatgtc	gtaagcccg	acgccggcat	4620
tctgatacgt	ggcaaaaatc	agcgttgagc	tgacaaagct	ccccggccgg	ttctcatgca	4680
ggttgtgcgg	accgaaatgc	gcccctttcg	ccacgtaatc	cgccttcatcc	ggcggcggga	4740
aggctggcga	gctcacgggg	tgggttggct	cgcggatata	aaacagccag	atcagcttct	4800
cgccgtcctc	ctggttatcg	agcaccgctt	catccagcac	caccagcaga	tgcgatccg	4860
gcagcggcag	cgcggtatgc	gttccgccgc	cgaacggcgg	gttccagtig	cgaaggctaa	4920
tcagcctcgg	ctgggtacgg	tccttgacat	ccagcagcgt	caggccgcgc	tcgcgccagc	4980

tgcgtaggcg tatccccggc aataatggcg tgatgcagcg catagcgitt gccctgcggc 5040
 cagtcgggtg ttccaccgcc cgcttggtgc atccccggca gccaccagcg cccggctact 5100
 tcgggcttac gcggatcggc cagatcgatg gtcaggaaga tctagtcggt aaaaccgtcg 5160
 atcagcgcag acacatacgc ccagcgcccg ccgacgtacc agatgcgggtg aataccgatg 5220
 ccgttaagcg acaggaaact gatticccgc gctgcgcggg agtggaata tcaaagatgc 5280
 gcagcccggc gctccagccc ctgtctgca catcgctgac cgtgtcacc accgagcggg 5340
 tctagtacac ctctcatca gcaaacggg cgtcagcaa cagatcccg gcgttgatca 5400
 ccagcagcag atcgctatgc gcctggagtg cacgttcag gtgcccggcg gcgcggcaat 5460
 atagttgacg gtgggtgggc gggtcggtc gcgaacatc accacggaaa aacctgcga 5520
 caccataatg ccgatatagg cgaatccgc gtgcaccatc agctgcacgc cgtccggacg 5580
 accgccctga tcgctatggc caatcagccg catattgcgg ctgtattcgg gggaaggtaa 5640
 tgcctacata ggggatccct ctgcccggg ggcatgggtt tccccctct cctgcggaga 5700
 gggccggggc gagggcacca ggccgccgc caccgccacc cggcttgatt ttattgttc 5760
 ttgccttcca gcctgcgaa ccacggcgcg ataaagtctt cggctctggc ccagccaggg 5820
 ataattttcc ccagcgacgc cagctttacc gctcccggtt gggccgccag cagcgcttg 5880
 ggaatcgctg ccgccttgaa gtcgtagggt gctggcgctg gctcgccggc gatctgttg 5940
 gcgatcagcc gcacgttggt cgcgccgata agctt 5975

<210> 16

<211> 899

<212> DNA

<213> *Candida albicans*

<220>

<223> Designated as CA-26

<400> 16

gaattcctag taagcgcaag tcatcagctt gcgttgatta cgtccctgcc ctttgtacac 60
 accgcccgtc gctactaccg attgaatggc ttagtgaggc ctccggattg gtttaggaaa 120

```

gggggcaacc tcattctgga accgagaagc tggtaaaact tggtaattta gaggaagtaa      180
aagtcgtaac aaggtttccg tagtgaacct gcggaaggat cattactgat ttgcttaatt      240
gcaccacatg tgtttttcct tgaacaaact tgccttgcgg tgggccccagc ctgccgccag      300
aggctctaaac ttacaaccaa ttttttatca acttgtcaca ccagattatt acttaatagt      360
caaactticaa caaacggatc tcttgggtct cgcagcgaaa tgcgatacgt aatatgaatt      420
gcagatattc gtgaatcatc gaatcttga acgcacattg cgccctctgg tattccggag      480
ggcatgcctg tttagcgtc gtttctccct caaacgcctg ggtttgggtg tgagcaatac      540
gacttgggtt tgcctgaaag acggtagtgg taaggcggga tcgtttgaca atggcttagg      600
tctaaccaaa aacattgctt gcggcggtaa cgtccaccac gtatacttc aaactttgac      660
ctcaaatcag gtaggactac ccgctgaact taagcatact aataagcgga ggaaaagaaa      720
ccaacaggga ttgcctcagt agcggcgagt gaagcggcaa aagctcaaat ttgaaatctg      780
gcgtcttttg cgtccgagtt gtaatttga gaaggtatct ttgggcccg ctttgtcta      840
tgttccttgg aacaggacgt cacagagggt gagaatcccg tgcgatgaga tgaccggg      899

```

<210> 17

<211> 189

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<223> Designated as CA-26-1

<400> 17

```

gcgcaagtca tcagcttgcg ttgattacgt ccttgcctt tgtacacacc gcccgtcgt      60
actaccgatt gaatggctta gtgaggcctc cggattgggt taggaaaggg ggcaacctca      120
ttctggaacc gagaagctgg tcaaacttgg tcatttagag gaagtaaaag tcgtaacaag      180
gtttccgta                                     189

```

<210> 18

<211> 224

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<223> Designated as CA-26-2

<400> 18

gctgggtttg gtgttgagca atacgacttg ggtttgcttg aaagacggta gtggttaaggc	60
gggatcgttt gacaatggct taggtctaac caaaaacatt gcttgcggcg gtaacgtcca	120
ccacgtatat cticaaactt tgacctcaaa tcaggttagga ctacccgctg aacttaagca	180
tatcaataag cggaggaaaa gaaaccaaca gggattgcct cagt	224

<210> 19

<211> 369

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<223> Designated as CA-26-3

<400> 19

aaacggatct ctigggttc cgcagcgaat gcgatcgtat atatgaattg cagatattcg	60
tgaatcctcg aatctttgaa cgcacattgc gccctctggg attccggagg gcatgcctgt	120
ttgagcgtcg ttctccctc aaaccgctgg gtttgggtgt gagcaatacg acttgggttt	180
gcttgaaaga cggtagtggt aaggcgggat cgtttgacaa tggcttaggt ctaacaaaaa	240
acattgcctg cggcggtaac gtccaccacg tataatcttca aactttgacc tcaaatcagg	300
taggactacc cgctgaactt aagcatatca ataagcggag gaaaagaaac caacagggat	360
tgccctcagt	369

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/31, G01N33/569, G01N33/53, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/31, G01N33/569, G01N33/53, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 89/10411 A (Fuso Yakuhi Kogyo Kabushiki Kaisha), 02 November, 1989 (02.11.89), & EP 366813 A & US 5358846 A	1-18
Y	WO 99/54502 A1 (Acad Ziekenhuis Groningen), 28 October, 1999 (28.10.99), & EP 957175 A1	1-18
Y	G.J. JANSSEN et al., Rapid Identification of Bacteria in Blood Cultures by Using Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes., Journal of Clinical Microbiology, Feb.2000, Vol.38, No.2, pages 814 to 817	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
23 August, 2002 (23.08.02)Date of mailing of the international search report
10 September, 2002 (10.09.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05107

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94/28115 A1 (FAFF O), 08 December, 1994 (08.12.94), & EP 707635 A1 & JP 8510136 W & US 6268123 B1	4-8
Y	JP 8-205893 A (Sumitomo Metal Industries, Ltd.), 13 August, 1996 (13.08.96), (Family: none)	7,8
Y	WO 96/31522 A1 (UNIV NEW YORK STATE), 10 October, 1996 (10.10.96), & US 5720928 A & EP 871640 A1	13
Y	WO 94/10341 A1 (FUSO PHARM IND. LTD.), 11 May, 1994 (11.05.94), & JP 6133798 A & EP 670373 A1 & US 5708159 A	1-18
Y	WO 94/01583 A1 (FUSO PHARM IND. LTD.), 20 January, 1994 (20.01.94), & EP 652291 A1 & US 5763188 A	1-18
A	Akiko NATSUHISA et al., Detection of Bacteria in Phagocyte-Smears from Septicemia-Suspected Blood by In Situ Hybridization Using Biotinylated Probes., Microbiol.Immunol. (1994), Vol.38, No.7, pages 511 to 517	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12Q1/68, C12N15/31, G01N33/569, G01N33/53, G01N33/566		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12Q1/68, C12N15/31, G01N33/569, G01N33/53, G01N33/566		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA(STN) MEDLINE(STN) WPI(DIALOG) BIOSIS(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 89/10411 A (FUSO YAKUHI KOGYO KK) 1989.11.02 & EP 366813 A & US 5358846 A	1-18
Y	WO 99/54502 A1 (ACAD ZIEKENHUIS GRONINGEN) 1999.10.28 & EP 957175 A1	1-18
Y	G. J. JANSEN et al., Rapid Identification of Bacteria in Blood Cultures by Using Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes., JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2000, Vol. 38, No. 2, p. 814-817,	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 <div style="float: right; width: 40%;"> の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 </div>		
国際調査を完了した日	23.08.02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子
		4B 9359  電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 94/28115 A1 (FAFF 0) 1994. 12. 08 & EP 707635 A1 & JP 8510136 W & US 6268123 B1	4 - 8
Y	JP 8-205893 A (住友金属工業株式会社) 1996. 08. 13 (ファミリーなし)	7, 8
Y	WO 96/31522 A1 (UNIV NEW YORK STATE) 1996. 10. 10 & US 5720928 A & EP 871640 A1	1 3
Y	WO 94/10341 A1 (FUSO PHARM IND LTD) 1994. 05. 11 & JP 6133798 A & EP 670373 A1 & US 5708159 A	1 - 1 8
Y	WO 94/01583 A1 (FUSO PHARM IND LTD) 1994. 01. 20 & EP 652291 A1 & US 5763188 A	1 - 1 8
A	Akiko NATSUHISA et al., Detection of Bacteria in Phagocyte-Smears from Septicemia-Suspected Blood by <i>In Situ</i> Hybridization Using Biotinylated Probes., Microbiol. Immunol. (1994), Vol. 38, No. 7, p. 511-517	1 - 1 8